

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA



TESIS DOCTORAL

**Identificación y caracterización funcional del complejo nuclear de proteínas
LSM de *Arabidopsis thaliana* en la respuesta de aclimatación a las
temperaturas bajas**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Tamara Hernández Verdeja

Director

Julio Salinas Muñoz

Madrid, 2014



TAMARA HERNÁNDEZ VERDEJA

TESIS DOCTORAL

MADRID 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL
DEL COMPLEJO NUCLEAR DE PROTEÍNAS LSM DE
Arabidopsis thaliana EN LA RESPUESTA DE
ACLIMATACIÓN A LAS TEMPERATURAS BAJAS

TESIS DOCTORAL
TAMARA HERNÁNDEZ VERDEJA
MADRID, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

IDENTIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL
DEL COMPLEJO NUCLEAR DE PROTEÍNAS LSM DE
Arabidopsis thaliana EN LA RESPUESTA DE
ACLIMATACIÓN A LAS TEMPERATURAS BAJAS

Memoria presentada por TAMARA HERNÁNDEZ VERDEJA,
inscrita en el programa de doctorado Genética y Biología Celular del
Departamento de Genética de la Facultad de Ciencias Biológicas de la
Universidad Complutense de Madrid, para optar al grado de Doctor
en Ciencias Biológicas.

Trabajo realizado en el Departamento de Biotecnología del Instituto
Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria y
en el Departamento de Biología Medioambiental del Centro de
Investigaciones Biológicas-CSIC de Madrid, bajo la dirección del
Doctor Julio Salinas Muñoz.

Madrid, 2014

VºBº DEL DIRECTOR

Julio Salinas Muñoz

Tamara Hernández Verdeja

Después de tanto tiempo son muchas las personas a las que quiero agradecer haber estado presentes de una u otra forma durante la elaboración de este trabajo. Por empezar por el principio a Ana Vázquez y Charo, por acogerme en su laboratorio, y a las personas en el departamento de Genética (Isa, Debby, Ander, Oskar, Julia, Javier y muchos otros). Estando allí sembré mis primeras Arabidopsis y me surgió la oportunidad hacer este trabajo. Especialmente a Julio Salinas, por haberme dado la oportunidad de incorporarme a su laboratorio para hacer la tesis y dejarme elegir con que complejo quería trabajar. A los compañeros del laboratorio cuando empecé, y que me enseñaron con paciencia como diseñar y hacer los experimentos. Mucha parte se la debo a Rosa y a Marisa, pero no menos a Beatriz, Rafa, Fernando y Joaquín. A los que han participado directamente en este trabajo, David que lo empezó y lo dejó en mis manos, a Carlos y Rosa con los que se formó el “LSM team” inicial cuando las LSM estaban en expansión, a Mar que llegó después y a los últimos en incorporarse Cristian y Rafa. Durante mi estancia en el laboratorio han ido y venido o llegado para quedarse muchas personas que también han aportado su granito de arena (o camiones llenos) y a las que quiero mencionar especialmente Esme, Javier, Raúl, Miguel Ángel, Teresa, Aurora, Iñaki, Juan Cruz, Ema, Philippe y Vero. No me puedo olvidar del curioso edificio Z y su gente. Sobre todo a los laboratorios de Jarillo, Manolo, Juan Carlos y Rosa, a Iván y a las chicas que estuvieron ahí para responder preguntas y echar una mano en muchos momentos y con los que ahora vuelvo a compartir edificio. A la gente del CIB, que nos ayudaron a instalarnos en el nuevo laboratorio y con los que también pasamos buenos ratos. A Mónica y a Pablo por hacer fotos estupendas incluso cuando las plantas estaban hechas un asco. Al grupo de genómica del CNB y José Manuel Franco que realizaron las hibridaciones de los arrays y los primeros análisis, y respondieron a mis infinitas preguntas. No fueron los únicos implicados en los análisis, Javier Forment también participó y Pablo González Gracia tradujo a un programa lo que de otra forma hubiera tenido que hacer a pedal (y posiblemente todavía estaría con ello). Por último a mi actual laboratorio en el CBGP, el laboratorio de Isabel Allona. A Isabel y a todos los del labo, Dani, Judy, Pablo, José Manuel, Mariano y sobre todo a Ali que me enseñó a trabajar con los chopos, y por sus clases maestras de qRT-PCRs.

Por último, fuera del círculo científico, pero si cabe más importantes quiero dar las gracias sobre todo a mis padres, que han aguantado todos estos años de tesis con paciencia. Y a mis amigos que también han estado ahí durante la tesis dándome su apoyo, algunos con conocimiento de causa. Eva, Jorge, Pablo y Susana, la biología nos junto y miles de historias nos han mantenido unidos todos estos años que espero que vayan a más y mejor. Marisa y Bea, porque después de una película, palomitas y un buen vino no resolvemos nada pero las cosas se ven de otra manera. No son los únicos, al resto os lo diré en persona.

¡Muchas gracias!

A mis padres con todo mi amor

“When you get a good result have a good dinner before you repeat it. Then at least you’ve had a good dinner”

Sir Eric Denton

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. El proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	3
1.1.1. Percepción de las temperaturas bajas y transmisión de la señal	4
1.1.2. Regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	7
1.1.2.1. Regulación transcripcional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	8
1.1.2.2. Regulación postranscripcional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	12
1.1.2.3. Regulación traduccional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	15
1.1.2.4. Regulación postraduccional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	16
1.2. Las proteínas LSMs	19
1.3. Planteamiento de la tesis	22
1.4. Objetivos de la tesis	23
2. MATERIALES Y MÉTODOS	25
2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento	27
2.2. Análisis de fenotipos de desarrollo	27
2.3. Tratamientos experimentales	29
2.4. Análisis de la expresión génica	29
2.4.1. Análisis mediante hibridaciones tipo <i>Northern</i>	29
2.4.2. Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real	30
2.4.3. Análisis transcriptómico con micromatrices de genoma completo	30
2.5. Comprobación de retención de intrones	31
2.6. Análisis de estabilidad de RNAs	31
2.7. Estudios de microscopía	32
2.7.1. Localización subcelular	32
2.7.2. Complementación bimolecular de la fluorescencia	32

2.8. Extracción de DNA	32
2.8.1. Extracción de DNA genómico de <i>Arabidopsis</i>	32
2.8.2. Extracción de DNA plasmídico de <i>Escherichia coli</i>	33
2.9. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados	33
2.10. Métodos de microbiología	33
2.10.1. Crecimiento	33
2.10.2. Preparación de células electrocompetentes	33
2.10.3. Transformación	34
2.11. Oligonucleótidos	34
2.12. Medios de cultivo	34
2.12.1. Medios de cultivo <i>in vitro</i> para <i>Arabidopsis</i>	34
2.12.2. Medios de cultivo para bacterias	34
2.13. Reactivos y soluciones	35
2.14. Análisis estadísticos	36
2.15. Programas informáticos	36
3. RESULTADOS	39
3.1. Identificación y caracterización de <i>RCI6</i> , un gen de <i>Arabidopsis</i> cuyos transcritos se acumulan en respuesta a temperaturas bajas	41
3.1.1 Caracterización de la expresión de <i>RCI6</i>	41
3.1.2. <i>RCI6</i> codifica una proteína similar a las proteínas LSM2 descritas en otros organismos	42
3.1.3. LSM2 forma parte de una familia de proteínas conservadas evolutivamente que también existe en <i>Arabidopsis</i>	43
3.1.4. Los genes <i>LSMs</i> de <i>Arabidopsis</i> se expresan de forma ubicua y sus transcritos se acumulan en respuesta a temperaturas bajas	46
3.2. Caracterización funcional del complejo nuclear LSM2-LSM8 de <i>Arabidopsis</i>	47
3.2.1. La proteína LSM8 de <i>Arabidopsis</i> se localiza en el núcleo	47
3.2.2. La proteína LSM8 de <i>Arabidopsis</i> interacciona <i>in vivo</i> con LSM2 y LSM4	48
3.2.3. La proteína LSM8 de <i>Arabidopsis</i> es esencial para la formación del complejo nuclear de <i>LSMs</i>	49
3.2.4. El complejo nuclear LSM2-LSM8 de <i>Arabidopsis</i> estabiliza el U6 snRNA	50

3.2.5. El complejo nuclear LSM2-LSM8 de Arabidopsis participa en el <i>splicing</i> de pre-mRNAs	52
3.3. El complejo nuclear LSM2-LSM8 es esencial para el correcto desarrollo de Arabidopsis	54
3.3.1. Los mutantes <i>lsm8</i> presentan alteraciones en el desarrollo	54
3.3.2. El complejo LSM2-LSM8 es necesario para el correcto <i>splicing</i> y expresión de genes de desarrollo	57
3.4. El complejo nuclear LSM2-LSM8 regula negativamente la respuesta de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis	60
3.4.1. Los mutantes <i>lsm8</i> tienen mayor capacidad de aclimatar a las temperaturas bajas que las plantas WT	60
3.4.2. El complejo nuclear LSM2-LSM8 es necesario para el correcto <i>splicing</i> de genes regulados por temperaturas bajas en Arabidopsis	60
3.4.3. El complejo LSM2-LSM8 regula la expresión génica en respuesta a las temperaturas bajas en Arabidopsis	63
4. DISCUSIÓN	67
5. CONCLUSIONES	87
6. BIBLIOGRAFÍA	91
7. ANEXO I: TABLAS	117
8. ANEXO II: PUBLICACIÓN	155
9. ANEXO III: ABSTRACT	177

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ruta genérica del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	3
Figura 2. Representación esquemática del papel de las hormonas vegetales en la aclimatación a las temperaturas bajas	7
Figura 3. Representación esquemática de la regulación transcripcional durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	11
Figura 4. Representación esquemática de la regulación postranscripcional durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	14
Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos postraduccionales implicados en la regulación del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	17
Figura 6. Complejos de proteínas LSMs	20
Figura 7. Esquema del ciclo de ensamblaje y desensamblaje de las snRNPs en el espliceosoma	21
Figura 8. Acumulación de mensajeros correspondientes a <i>RCI6</i> en respuesta a temperaturas bajas	41
Figura 9. Alineamiento de la secuencia de <i>RCI6</i> y las proteínas LSM2 de otros organismos eucariotas	42
Figura 10. Alineamiento de las proteínas LSMs de Arabidopsis	43
Figura 11. Análisis filogenético de las proteínas LSMs de diferentes organismos modelo	44
Figura 12. Análisis filogenético de las proteínas LSMs de diferentes especies vegetales	45
Figura 13. Análisis de la expresión de los genes <i>LSMs</i> de Arabidopsis en diferentes órganos y en respuesta a frío	46
Figura 14. Localización subcelular de la proteína LSM8 de Arabidopsis	47
Figura 15. Interacciones de la proteína LSM8 de Arabidopsis en el complejo nuclear	48
Figura 16. Identificación de los mutantes <i>lsm8-1</i> y <i>lsm8-2</i>	49
Figura 17. Localización subcelular de LSM4-GFP en ausencia de LSM8	50
Figura 18. Niveles de U6 snRNA en ausencia del complejo nuclear LSM2-LSM8 de Arabidopsis	51
Figura 19. Estabilidad del U6 snRNA en ausencia del complejo nuclear LSM2-LSM8 de Arabidopsis	52
Figura 20. Retención de intrones en ausencia del complejo LSM2-LSM8 de	

Arabidopsis	53
Figura 21. Germinación de los mutantes <i>lsm8</i> y fenotipos de sus cotiledones	55
Figura 22. Fenotipos de la roseta y las raíces de los mutantes <i>lsm8</i>	56
Figura 23. Fenotipos de floración, de las silicuas y las semillas de los mutantes <i>lsm8</i>	57
Figura 24. Retención de intrones en genes implicados en el desarrollo de Arabidopsis en ausencia del complejo LSM2-LSM8	58
Figura 25. Alteraciones en la expresión de genes implicados en el desarrollo de Arabidopsis en ausencia del complejo LSM2-LSM8	59
Figura 26. Tolerancia a las temperaturas de congelación de los mutantes <i>lsm8</i>	61
Figura 27. Retención de intrones en genes regulados por frío en respuesta a temperaturas bajas en ausencia del complejo LSM2-LSM8 de Arabidopsis	62
Figura 28. Alteraciones en la expresión de genes regulados por frío en ausencia del complejo LSM2-LSM8 de Arabidopsis en respuesta a temperaturas bajas	64
Figura 29. Comparaciones de genes cuyo <i>splicing</i> regulan diferentes componentes del espliceosoma en condiciones control de crecimiento	72
Figura 30. Clasificación ontológica de genes cuyo <i>splicing</i> o expresión controla el complejo LSM2-LSM8	72
Figura 31. Clasificación ontológica de genes cuyo <i>splicing</i> controla el complejo LSM2-LSM8 en respuesta a temperaturas bajas	77
Figura 32. Comparaciones de genes cuyo <i>splicing</i> controlan LSM8, RCF1 y STA1 tras la exposición a 4°C	78
Figura 33. Clasificación ontológica de genes cuya expresión regula el complejo LSM2-LSM8 en respuesta a temperaturas bajas	80
Figura 34. Comparaciones de genes cuya expresión controlan LSM8, RCF1 y STA1 tras la exposición a 4°C	83
Figura 35. Modelo de actuación propuesto para el complejo LSM2-LSM8 en la regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Elementos reguladores en <i>cis</i> de respuesta a temperaturas bajas	9
Tabla 2. Plásmidos	33
Tabla 3. Porcentajes de identidad (I) y similaridad (S) entre las proteínas LSMs de <i>Arabidopsis</i>	43
Tabla 4. Número y porcentaje de plántulas mutantes <i>lsm8</i> con anomalías en los cotiledones	55
Tabla I. Oligonucleótidos	119
Tabla II. Intrones retenidos en el mutante <i>lsm8-1</i> en condiciones control	122
Tabla III. Genes con la expresión más alta o más baja en el mutante <i>lsm8-1</i> en condiciones control	131
Tabla IV. Intrones retenidos en el mutante <i>lsm8-1</i> tras la exposición a 4°C	136
Tabla V. Genes con la expresión más alta o más baja en el mutante <i>lsm8-1</i> tras la exposición a 4°C	146
Tabla VI. Fenotipos de desarrollo descritos en mutantes de componentes del espliceosoma	151

1. INTRODUCCIÓN

1.1. El proceso de aclimatación a las temperaturas bajas

Los seres vivos se ven frecuentemente sometidos a cambios en las condiciones ambientales externas que pueden afectar a su crecimiento, desarrollo y reproducción. A diferencia de otros organismos, las plantas no tienen la capacidad de desplazarse, por lo que han desarrollado distintos mecanismos para adaptarse a los cambios del medio que les son desfavorables. Las temperaturas bajas son un factor ambiental que afecta negativamente al crecimiento y desarrollo de las plantas, limitando su distribución geográfica y el rendimiento de los cultivos. Este factor ambiental es especialmente importante en las regiones templadas, en las que se producen cambios significativos de temperatura entre las diferentes estaciones. Las plantas originarias de estas regiones han desarrollado un proceso adaptativo, denominado aclimatación a las temperaturas bajas, mediante el cual aumentan su tolerancia a las temperaturas de congelación, tras una exposición previa a temperaturas entre 0° y 10°C (Levitt, 1980; Thomashow, 1999).

El proceso de aclimatación a las temperaturas bajas es muy complejo y está caracterizado por numerosos cambios fisiológicos y moleculares (Salinas, 2002; Theocharis y col., 2012). Entre otros, se producen cambios en la composición de las membranas celulares (Uemura y Steponkus, 1999; Degenkolbe y col., 2012), y aumentos en los niveles de Ca^{2+} citosólico (Knight y col., 1996; Plieth y col., 1999; Catalá y col., 2003), en la concentración

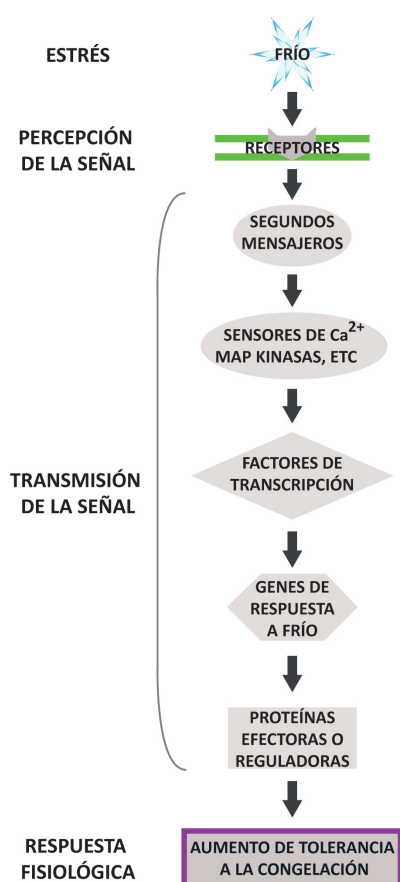


Figura 1. Ruta genérica del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

La señal es percibida por receptores, posiblemente localizados en la membrana celular, activando una cascada de señalización intracelular que incluye segundos mensajeros y provoca la expresión de múltiples genes de respuesta a frío cuyos productos hacen que la planta aumente su tolerancia a las temperaturas de congelación.

de hormonas, como el ácido abscísico (ABA) (Chen y col., 1983; Lang y col., 1994), de solutos compatibles u osmoprotectores (Koster y Lynch, 1992; Wanner y Junttila, 1999), y de la actividad antioxidante (Airaki y col., 2012). Además, para evitar daños en el aparato fotosintético, se producen modificaciones en las membranas de los tilacoides, así como un aumento de las enzimas del ciclo de Calvin y de pigmentos fotoprotectores (Ensminger y col., 2006; Ivanov y col., 2012). Todos estos cambios están mediados por distintas redes de señalización intracelular relacionadas entre sí (Salinas, 2002). De forma general, el proceso de aclimatación comienza con la percepción de la señal, que en este caso es la bajada de la temperatura, por receptores que inician la señalización para activar factores de transcripción que regulan a su vez la expresión de genes de respuesta (Figura 1). Los productos de estos genes, directa o indirectamente, contribuyen a la adaptación fisiológica de las plantas para incrementar su tolerancia a las temperaturas de congelación (Salinas, 2002; Huang y col., 2012).

1.1.1. Percepción de las temperaturas bajas y transmisión de la señal

La percepción del descenso de temperatura es el primer paso en la inducción de la respuesta de aclimatación. A pesar de su importancia, todavía no se ha identificado el mecanismo mediante el cual las plantas son capaces de detectar la bajada de la temperatura. Parece que podría existir más de un sistema de percepción, y las evidencias sugieren que las plantas son capaces de medir la temperatura absoluta, la tasa de variación, y el tiempo de exposición a las temperaturas bajas (Knight y Knight, 2012).

Uno de los primeros modelos de percepción descritos se basa en el efecto físico, rápido y directo del frío sobre la fluidez de las membranas celulares, que aumentan su rigidez. Los estudios iniciales se realizaron en cianobacterias, y más tarde en células de alfalfa y *Brassica napus*, alterando artificialmente la fluidez de la membrana (Vigh y col., 1993; Örvar y col., 2000; Sangwan y col., 2001; Sangwan y col., 2002). Recientemente, estudios realizados en células de *Arabidopsis* con alteraciones en desaturasas de ácidos grasos han corroborado los resultados anteriores (Vaultier y col., 2006). Todos estos resultados sugieren que la pérdida de fluidez de la membrana es una de las primeras respuestas de las plantas a las temperaturas bajas.

Los cambios de fluidez de la membrana necesitan ser transmitidos al interior celular, y en el caso de la cianobacteria *Synechocystis* se ha determinado que los sensores de dichos cambios son reguladores de dos componentes del tipo histidina quinasas (Suzuki y col., 2000). En plantas, no se han encontrado ortólogos de estas histidina quinasas. No obstante, se ha descrito que este tipo de receptores de citoquinas participan en la señalización de la respuesta a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*, pero no se ha establecido su posible papel como sensores de cambios en la fluidez de la membrana (Jeon y col., 2012).

Otro posible mecanismo sensor de los cambios en la fluidez de la membrana es la

desestabilización del citoesqueleto. En células vegetales, las temperaturas bajas provocan una rápida despolimerización de los microtúbulos, que vuelven a polimerizar con la subida de temperatura (Hepler y Hush, 1996). Es más, en protoplastos de *Nicotiana* la disrupción del citoesqueleto mediante tratamientos químicos eleva la magnitud del incremento de Ca^{2+} que se produce en respuesta a frío (ver abajo; Mazars y col., 1997), y aumenta la expresión de genes inducibles por frío como ocurría con la disminución de fluidez de la membrana (Örvar y col., 2000; Sangwan y col., 2001). Actualmente, se está estudiando la implicación de los microdominios de membrana y sus componentes en la respuesta a las temperaturas bajas. Se ha observado que el frío induce cambios en la composición de estos microdominios, como la disminución de los componentes del citoesqueleto asociados, lo que sugiere que es en estas regiones concretas donde se produce la interacción de la membrana con el citoesqueleto y donde ocurrirían los cambios del citoesqueleto en respuesta a las temperaturas bajas (Minami y col., 2009).

En diferentes organismos eucariotas se ha descrito la función del Ca^{2+} como segundo mensajero en la transducción de señales. Knight y col., describieron que las temperaturas bajas inducían un aumento fuerte y transitorio de la concentración de Ca^{2+} citosólico en tabaco y en *Arabidopsis* (Knight y col., 1991; Knight y col., 1996). Esta entrada de Ca^{2+} en el citosol es esencial para el proceso de aclimatación, ya que el tratamiento con quelantes de Ca^{2+} o inhibidores de los canales de Ca^{2+} reduce la expresión de genes inducibles por frío y la capacidad de aclimatación de células de alfalfa y *Arabidopsis* (Monroy y col., 1993; Tähtiharju y col., 1997). La eficacia del Ca^{2+} como segundo mensajero depende de la regulación de sus niveles en los distintos compartimentos celulares. Los niveles basales de Ca^{2+} , por tanto, deben ser restablecidos mediante transporte activo. CALCIUM EXCHANGER 1 (CAX1), de *Arabidopsis*, fue el primer antiportador de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ descrito en plantas y estudios genéticos han permitido establecer su papel durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Hirschi y col., 1996; Hirschi, 1999; Catalá y col., 2003; Cheng y col., 2003).

A parte del Ca^{2+} , hay otros segundos mensajeros que parecen estar implicados en la señalización de las temperaturas bajas y que a su vez participan en los aumentos de los niveles de Ca^{2+} , lo que indicaría que actúan de intermediarios en la transmisión de la señal de Ca^{2+} . El ADP-ribosa cíclico provoca la liberación de Ca^{2+} desde las vacuolas, y en hojas de *Brassica napus* induce la expresión de genes de respuesta a frío, así como un incremento de la tolerancia a la congelación (Sangwan y col., 2001). Mediante estudios farmacológicos, se determinó la implicación del inositol trifosfato (IP_3) en la elevación de Ca^{2+} en respuesta a frío en *Arabidopsis* (Knight y col., 1996). La identificación y caracterización del mutante *fiery 1* (*fry1*) de *Arabidopsis*, deficiente en una inositol polifosfato 1-fosfatasa del catabolismo del IP_3 , confirmó la implicación de este último y del metabolismo de los fosfolípidos en la señalización de las temperaturas bajas y otros estreses abióticos (Xiong y col., 2001a). Por otra parte, estudios proteómicos recientes en *Arabidopsis* han revelado que el tratamiento con adenosina 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP), segundo mensajero

relacionado igualmente con incrementos transitorios de Ca^{2+} , aumenta los niveles de proteínas de respuesta a frío (Thomas y col., 2013), indicando que también participa en la transmisión de la señal durante esta respuesta adaptativa.

Los aumentos transitorios de Ca^{2+} son percibidos por proteínas de unión a Ca^{2+} , de las que existen tres tipos principales: calmodulinas (CaMs), proteínas tipo calcineurina B (CBLs) y proteína quinasas dependientes de Ca^{2+} (CDPKs). Miembros de estos tres grupos han sido implicados en la transducción de la señal generada por las temperaturas bajas. En cuanto a las CaMs, desde hace tiempo se conocen algunas cuyos genes están regulados por frío, como *NpCaM-1* de tabaco (Van Der Luit y col., 1999), o *TOUCH 2 (TCH2)* y *TOUCH 3 (TCH3)* de *Arabidopsis* (Polisensky y Braam, 1996). Las CaMs no tienen actividad catalítica, si no que interaccionan con diversas proteínas diana regulando su actividad (Yang y Poovaiah, 2003). Se ha caracterizado recientemente, en *Arabidopsis*, una quinasa tipo receptor dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CRLK1) que regula positivamente la tolerancia a la congelación (Yang y col., 2010). De entre las CBLs, se ha determinado que CBL1 de *Arabidopsis* es un regulador negativo de la respuesta a las temperaturas bajas (Cheong y col., 2003). Las CBLs interaccionan específicamente con proteína quinasas, denominadas CBL-INTERACTING PROTEIN KINASES (CIPKs), siendo la CIPK3 de *Arabidopsis*, cuyo gen es inducible por frío, un regulador de la respuesta a las temperaturas bajas (Kim y col., 2003). Las CDPKs, por su parte, son a la vez sensores de Ca^{2+} y efectoras por su actividad proteína quinasa. Desde hace tiempo se conoce su implicación en el proceso de aclimatación, ya que el tratamiento de células de alfalfa con W7, un antagonista de CDPKs, impide el desarrollo de la tolerancia a la congelación (Monroy y col., 1993). Se han descrito CDPKs de diferentes especies que están reguladas por temperaturas bajas y que, por tanto, pueden estar implicadas en su señalización (Monroy y Dhindsa, 1995; Berberich y Kusano, 1997; Saijo y col., 2000; Martin y Busconi, 2001).

Las plantas expuestas a frío presentan características de crecimiento diferentes a aquellas que crecen en condiciones favorables y, dado que las hormonas son reguladores cruciales del desarrollo, se han llevado a cabo muchos estudios para dilucidar su papel en el proceso de aclimatación. Varias hormonas han sido identificadas como intermediarios en la señalización de las temperaturas bajas (Figura 2). De acuerdo con un papel en la transmisión de la señal durante esta respuesta adaptativa, se ha determinado que los niveles de ABA (Chen y col., 1983; Lang y col., 1994), poliaminas (Lee y col., 1995; Pillai y Akiyama, 2004; Cuevas y col., 2008; Kovacs y col., 2010), óxido nítrico (Corpas y col., 2008; Zhao y col., 2009), etileno (Ciardi y col., 1997; Yu y col., 2001; Wang y col., 2012a; Catalá y col., 2014) y jasmonato (Hu y col., 2013) aumentan tras la exposición de las plantas a temperaturas bajas. Se ha demostrado que el tratamiento exógeno con ABA, jasmonato o el precursor de etileno ácido 1-aminociclopropano-1-carboxílico aumenta la tolerancia de las plantas a la congelación (Chen y col., 1983; Lang y col., 1994; Zhang y Huang, 2010; Hu y col., 2013; Catalá y col., 2014). Además, análisis genéticos han confirmado la función de estas hormonas como reguladores positivos del proceso de aclimatación (Gilmour

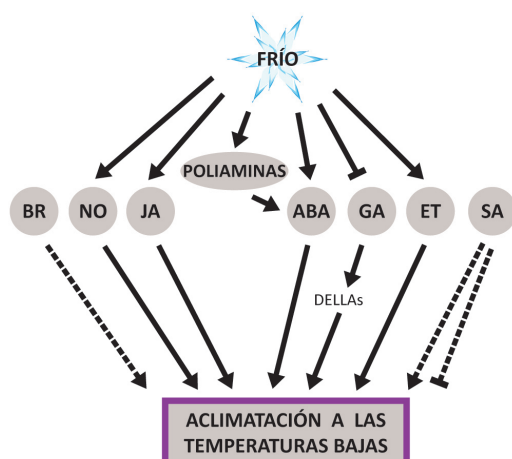


Figura 2. Representación esquemática del papel de las hormonas vegetales en la aclimatación a las temperaturas bajas.

Brasinoesteroides (BR), óxido nítrico (NO), ácido jasmónico (JA), ácido abscísico (ABA), giberelinas (GA), ácido salicílico (SA) y etileno (ET). Las líneas acabadas en flecha o en líneas transversales indican regulación positiva o negativa, respectivamente. Las líneas continuas o discontinuas indican rutas demostradas o teóricas, respectivamente.

y Thomashow, 1991; Llorente y col., 2000; Cuevas y col., 2008; Zhao y col., 2009; Hu y col., 2013; Catalá y col., 2014). A diferencia de las hormonas mencionadas, las giberelinas bioactivas disminuyen cuando las plantas son expuestas a frío (Achard y col., 2008). El descenso de las giberelinas promueve la acumulación de las proteínas DELLAs, que son las que contribuyen al desarrollo del proceso de aclimatación, ya que la mutación de dos de los genes que codifican DELLAs, *GA-INSENSITIVE* (*GAI*) y *REPRESSOR OF GA 1-3* (*RGA*), disminuye la capacidad de *Arabidopsis* de aclimatar (Achard y col., 2008).

El papel de otras hormonas en la regulación de la respuesta a las temperaturas bajas, sin embargo, no ha podido ser establecido claramente (Figura 2). Los brasinoesteroides parece que podrían actuar como reguladores positivos, puesto que el tratamiento de plantas de *Arabidopsis* y *Brassica napus* expuestas a temperaturas bajas con esta hormona aumenta los niveles de inducción de genes regulados por frío (Kagale y col., 2007; Divi y Krishna, 2010). En cuanto al ácido salicílico (SA), mientras que mutantes de *Arabidopsis* con mayores niveles de SA son menos tolerantes a la congelación y tienen menor inducción de genes regulados por frío (Miura y Ohta, 2010), los mutantes de *Arabidopsis* defectivos en *ISOCHORISMATE SYNTHASE 1* (*ICS1*), que codifica una enzima de la biosíntesis de SA, no presentan alteraciones en su tolerancia a la congelación (Kim y col., 2013b).

1.1.2. Regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas

Uno de los cambios principales que se producen durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas es una extensa remodelación del transcriptoma. Análisis globales de expresión génica en *Arabidopsis* revelan que alrededor de un 4% de los genes están regulados por temperaturas bajas (Fowler y Thomashow, 2002; Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006; Matsui y col., 2008; Zeller y col., 2009). De estos, en torno a dos tercios aumentan su expresión y, entre ellos, un buen número (17%) codifica factores

de transcripción o proteínas de regulación de la transcripción (Lee y col., 2005). Este número aumenta (24%) si solo se consideran los genes cuya expresión se modifica de manera rápida y transitoria tras la exposición a temperaturas bajas (Lee y col., 2005), lo que sugiere que en respuesta a este estrés abiótico se produce, principalmente, una activación transcripcional. Dada la relevancia de esta activación de la expresión génica en la respuesta de aclimatación, se ha invertido mucho trabajo en la identificación y caracterización de elementos reguladores en *cis* y en *trans* responsables de los cambios en la expresión génica en respuesta a las temperaturas bajas. Por otro lado, en los últimos años se están describiendo nuevos mecanismos de regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación que afectan al metabolismo y procesamiento de RNAs, así como a la síntesis y modificación de proteínas (Viswanathan y Zhu, 2002; Barrero-Gil y Salinas, 2013).

1.1.2.1. Regulación transcripcional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas

El estudio de los promotores de los genes *COLD REGULATED 15B* (*COR15B*) y *RESPONSIVE TO DESICCATION 29A* (*RD29A*) de *Arabidopsis*, ambos inducibles por frío, permitió identificar el primer elemento regulador en *cis* de respuesta a temperaturas bajas en plantas (Baker y col., 1994; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994). Este motivo (CCGAC), denominado *Dehydration-Responsive Element* (DRE) o *C-Repeat* (CRT), también aparecía en otros genes regulados por frío en distintas especies como maíz (Wang y col., 2008), trigo (Ouellet y col., 1998), o *Brassica napus* (Jiang y col., 1996). Posteriormente, se han identificado otros elementos en *cis* que participan en la regulación de la respuesta a temperaturas bajas que se muestran en la Tabla 1.

Mediante ensayos de un híbrido en levaduras, se identificó en *Arabidopsis* una proteína de unión a CRT/DRE, denominada C-REPEAT BINDING FACTOR 1 (CBF1) o DRE-BINDING 1B (DREB1B) (Stockinger y col., 1997; Liu y col., 1998). CBF1 pertenece a una pequeña familia de proteínas que actúan como activadores transcripcionales, junto con CBF2 y CBF3, también llamados DREB1C y DREB1A, respectivamente (Gilmour y col., 1998; Liu y col., 1998; Medina y col., 1999). La expresión de los genes correspondientes, *CBF1-CBF3*, está regulada específicamente por frío de forma rápida y transitoria (Gilmour y col., 1998; Liu y col., 1998; Medina y col., 1999). Los CBFs controlan la expresión de aproximadamente el 28% de los genes regulados por frío en *Arabidopsis* (Vogel y col., 2005), y la sobreexpresión de cada uno de ellos aumenta la tolerancia a la congelación, indicando su importancia en el proceso de aclimatación (Jaglo-Ottosen y col., 1998; Kasuga y col., 1999). Pese a que inicialmente se pensaba que los 3 CBFs eran funcionalmente equivalentes, las diferencias observadas en sus patrones de expresión y análisis genéticos han permitido concluir que CBF2 regula negativamente la expresión de *CBF1* y *CBF3* (Novillo y col., 2004), y que estos últimos no están implicados en la regulación de ninguno

de los otros *CBFs* (Novillo y col., 2007). De esta forma, se asegura una expresión precisa del regulón de los *CBFs* y el completo desarrollo del proceso de aclimatación en *Arabidopsis* (Novillo y col., 2004; Novillo y col., 2007).

Hasta el momento, se han identificado varias proteínas responsables de la inducción por frío de los *CBFs*, entre los que se encuentra INDUCER OF CBF EXPRESSION 1 (ICE1), un activador transcripcional que se une a motivos MYC presentes en el promotor de *CBF3* (Chinnusamy y col., 2003). ICE1, sin embargo, no afecta a la expresión de *CBF1* ni *CBF2* (Chinnusamy y col., 2003). La importancia de ICE1 queda reflejada por el hecho de que un 40% de los genes regulados por frío en *Arabidopsis* parecen estar controlados por ICE1 (Lee y col., 2005). ICE1 se expresa constitutivamente, pero *CBF3* solo se induce en respuesta a frío (Chinnusamy y col., 2003), lo que sugiere una activación postraduccional de ICE1 en respuesta a temperaturas bajas (ver Sección 1.1.2.4.). Recientemente, se ha identificado, también en *Arabidopsis*, la proteína ICE2, cuya sobreexpresión aumenta la inducción de *CBF1* y la tolerancia a la congelación, pero todavía no se ha demostrado su capacidad de unión a cajas MYC (Fursova y col., 2009). Un análisis del promotor de *CBF2* permitió identificar una serie de motivos denominados *Conserved Motifs* (CM) que controlaban su inducción por frío (Doherty y col., 2009). La secuencia de uno de ellos, CM2, es igual al

Tabla 1. Elementos reguladores en *cis* de la respuesta a temperaturas bajas.

Elemento <i>cis</i>	Secuencia	Factor de transcripción	Especie	Referencias
CRT/DRE	CCGAC	CBFs	Arabidopsis	(Baker y col., 1994; Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1994)
CRT/DRE	(A/G)(C/T)CGAC	ZmCBF3	Maíz	(Wang y col., 2008)
ICEr1	GGACACATGTCAGA		Arabidopsis	(Zarka y col., 2003)
ICEr2	ACTCCG		Arabidopsis	(Zarka y col., 2003)
MYC	CA(N/A)(N/A)TG	ICE1	Arabidopsis	(Chinnusamy y col., 2003)
MYB	G(G/T)T(A/T)G(T/G)T(A/G)	MYB15	Arabidopsis	(Agarwal y col., 2006)
CM2/CG-1	CCGCGT	CAMTA	Arabidopsis	(Doherty y col., 2009)
CM1, CM3-CM7	Varias		Arabidopsis	(Doherty y col., 2009)
GCC-box	AGCCGCC	JERF3	Tabaco	(Wu y col., 2008)
EE	AAAATATCT	CCA1 y LHY	Arabidopsis	(Mikkelsen y Thomashow, 2009; Dong y col., 2011)
G-box	CACGTG	PIF4 y PIF7	Arabidopsis	(Lee y Thomashow, 2012)
Z-box	ATACGTGT	HY5	Arabidopsis	(Catalá y col., 2011)
CCAAT-box	CCAAT	AtHAP5A	Arabidopsis	(Shi y col., 2014)
ABRE	GCCACGTGGC	SGFB-1	Soja	(Kim y col., 2001)

elemento CG-1 que es reconocido por una familia de factores de transcripción que unen calmodulina denominados CALMODULIN BINDING TRANSCRIPTION ACTIVATORS (CAMTAs). En *Arabidopsis*, tres miembros de la familia, CAMTA1, CAMTA2 y CAMTA3, actúan conjuntamente en la inducción rápida y transitoria de los CBFs en respuesta a temperaturas bajas, además de regular un 15% de los genes inducibles por frío que no están bajo el control de los CBFs (Kim y col., 2013b). El gen *MYB15* de *Arabidopsis* codifica una proteína que se une a los motivos MYB presentes en los promotores de los CBFs regulando su expresión negativamente (Agarwal y col., 2006). Además, *MYB15*, cuya expresión se induce por frío, está regulado negativamente por ICE1 (Agarwal y col., 2006). Otro factor de transcripción implicado en la regulación de los CBFs es la proteína tipo dedo de zinc ZAT12 (Vogel y col., 2005). Sorprendentemente, ZAT12 regula negativamente la inducción por frío de los CBFs, lo que sugiere que está participando en la modulación de su expresión (Vogel y col., 2005). Los niveles de inducción de los CBFs también están regulados por el reloj circadiano (Fowler y col., 2005), y se ha determinado que varios componentes del reloj, como CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 (CCA1) y LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), participan en dicha regulación (Nakamichi y col., 2009; Dong y col., 2011). Todos estos resultados indican la existencia de una compleja red de regulación de la transcripción alrededor de los CBFs durante el proceso de aclimatación, que asegura el desarrollo completo y preciso de esta respuesta adaptativa (Figura 3).

La expresión génica durante el proceso de aclimatación también está fuertemente regulada a nivel transcripcional de forma independiente de los CBFs (Figura 3). En *Arabidopsis*, tanto HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY GENES 9 (HOS9), un factor de transcripción tipo homeodominio, como LONG VEGETATIVE PHASE 1 (LOV1), un factor de transcripción con dominio NAC, controlan la expresión de genes inducibles por frío y actúan como reguladores positivos de del proceso de aclimatación (Zhu y col., 2004; Yoo y col., 2007). ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5) es otro factor de transcripción que regula positivamente el proceso de aclimatación, y ha sido establecido como un nexo de unión entre las rutas de señalización por luz y frío (Catalá y col., 2011). Los niveles de HY5 están controlados a nivel transcripcional y también a nivel postraducciona (ver Sección 1.2.4) (Catalá y col., 2011).

En los promotores de algunos de los genes inducibles por frío, además del motivo DRE, se encuentran motivos en *cis* de respuesta a ABA conocidos como *ABA-Response Elements* (ABREs) (Guiltinan y col., 1990). A estos motivos se unen factores de transcripción tipo bZIP, denominados ABRE BINDING FACTORS o ABA-RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEINS (ABFs o AREBs), que activan la expresión génica (Choi y col., 2000; Uno y col., 2000). Los 4 genes *ABFs* identificados en *Arabidopsis* aumentan su expresión en respuesta a ABA, y *ABF1* y *ABF4*, además, se inducen por frío (Choi y col., 2000), indicando que existen interacciones entre las rutas de señalización por temperaturas bajas y otros estreses

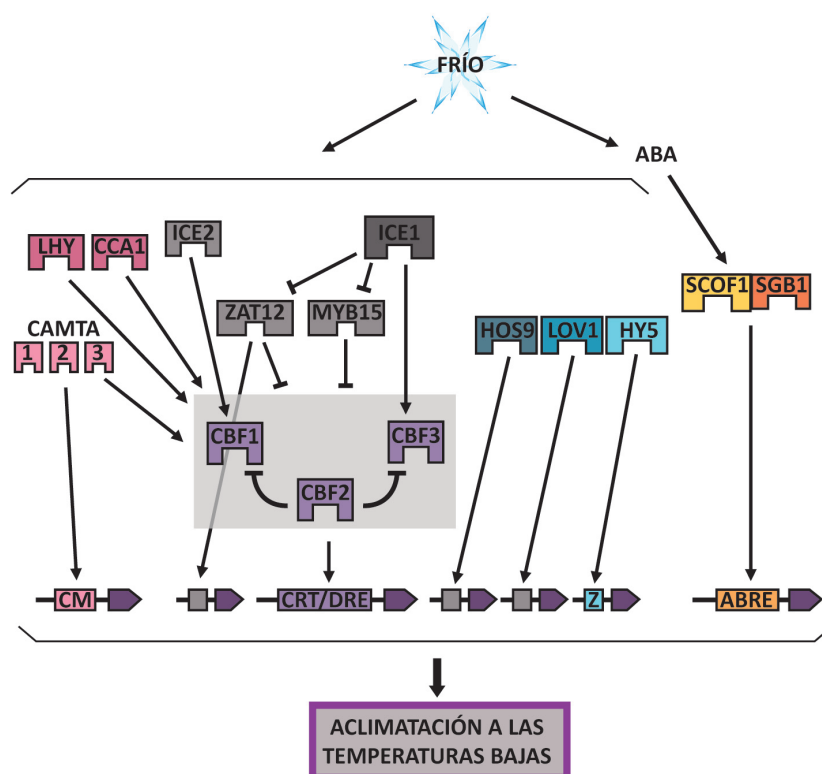


Figura 3. Representación esquemática de la regulación transcripcional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

La bajada de las temperaturas provoca una activación de factores de transcripción que modulan la expresión de genes de respuesta a frío. Se han identificado dos grupos de factores de transcripción, uno mayoritario independiente de la señalización por ABA, y otro mediado por ABA. Los CBFs son claves para el proceso de aclimatación y la expresión de sus respectivos genes está a su vez estrictamente regulada, tanto positiva como negativamente, por diferentes factores de transcripción. Los factores de transcripción están representados por rectángulos con cavidades y los elementos en *cis* a los que se unen están representados por cajas. Las líneas acabadas en flecha o en líneas transversales indican regulación positiva o negativa, respectivamente.

abióticos. La caracterización funcional del gen *SOYBEAN COLD-INDUCIBLE FACTOR 1* (*SCOF1*) de soja, que codifica un factor de transcripción que se induce en respuesta a frío y en menor medida por ABA (Kim y col., 2001), ha contribuido a comprender mejor el papel de los motivos ABRE en la regulación transcripcional de la expresión génica en respuesta a temperaturas bajas. La sobreexpresión de *SCOF1* en *Arabidopsis* provoca la expresión constitutiva de genes inducibles por frío y el aumento de la tolerancia constitutiva a la congelación. *SCOF1* actúa interaccionando con el factor de transcripción *SOYBEAN G-BOX BINDING FACTOR 1* (SGBF-1) de soja, provocando un aumento en su capacidad de unirse específicamente a motivos ABRE (Kim y col., 2001) (Figura 3).

1.1.2.2. Regulación postranscripcional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas

Análisis transcriptómicos en respuesta a las temperaturas bajas han revelado cambios en la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con el procesamiento y metabolismo de RNAs (Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005), lo que sugiere que la expresión génica durante el proceso de aclimatación está regulada también a nivel postranscripcional (Figura 4).

En *Escherichia coli*, las proteínas denominadas COLD SHOCK PROTEINS (CSP) promueven la adaptación al frío desestabilizando la estructura secundaria de los mRNAs lo que impide la terminación de la transcripción y favorece la traducción (Nakaminami y col., 2006). En plantas, también se han encontrado CSPs, algunas de las cuales son capaces de complementar los fenotipos de sensibilidad a frío de *E. coli* deficientes en CSPs (Nakaminami y col., 2006; Kim y col., 2007a). De los 4 genes que codifican proteínas CSPs en *Arabidopsis*, hay evidencias genéticas de que CSP3 regula positivamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas, controlando la expresión de 19 genes de forma independiente de los CBFs (Kim y col., 2009). CSP2, por su parte, regula negativamente esta respuesta adaptativa y el regulón de los CBFs (Sasaki y col., 2013). Otras proteínas que actúan como chaperonas de RNAs, y pueden complementar *E. coli* deficientes en CSPs (Kim y col., 2007a), son las GLICINE RICH PROTEINS (GRPs). Al menos tres de estas proteínas de *Arabidopsis*, AtRZ-1A, GRP2 y GRP7 están involucradas en la tolerancia a la congelación (Kim y col., 2005; Kim y col., 2007b; Kim y col., 2008). AtRZ-1A y GRP2, regulan positivamente el proceso de aclimatación (Kim y col., 2005; Kim y col., 2007b), mientras que GRP7 solo se ha descrito su implicación en la tolerancia constitutiva a la congelación (Kim y col., 2008). Por el momento, solo se ha establecido la función de GRP2, que se localiza en la mitocondria y controla la expresión génica en respuesta a temperaturas bajas (Kim y col., 2007b), y de GRP7, que interacciona con CSP3 y controla la exportación de mRNAs al citoplasma en condiciones de frío (Kim y col., 2008; Kim y col., 2013a).

Los precursores de RNAs mensajeros (pre-mRNAs), al tiempo que son transcritos por la RNA polimerasa II sufren una serie de modificaciones, como la poliadenilación del extremo 3', la adición de la caperuza en 5', y la eliminación de los intrones (*splicing*), que dan lugar al mRNA maduro que es transportado al citoplasma para ser traducido. Hasta el momento, solo se han identificado dos proteínas que afectan conjuntamente a la poliadenilación y la adición de la caperuza, SHINY 1 (SHI1) y FIERY 2/C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1/SHINY 4 (FRY2/CPL1/SHI4), implicadas en el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Se ha podido determinar que FRY2/CPL1/SHI4 es un regulador positivo de la aclimatación, y que tanto FRY2/CPL1/SHI4 como SHI1 afectan a la inducción de los CBFs y sus genes diana en respuesta a frío (Koiwa y col., 2002; Xiong y col., 2002; Jiang y col., 2013). Además, en condiciones control ambas

proteínas afectan a la poliadenilación y la adición de la caperuza de genes inducibles por estrés abiótico (Jiang y col., 2013). Se ha propuesto un mecanismo de acción en el que SHI1 y FRY2/CPL1/SHI4 formarían un complejo que inhibiría la transcripción y los procesos cotranscripcionales, modulando la RNA polimerasa II (Jiang y col., 2013). Se ignora, sin embargo, como regularían la expresión génica durante el proceso de aclimatación (Jiang y col., 2013). Hasta la fecha, solo se han identificado 3 proteínas de *Arabidopsis* implicadas en el *splicing* de pre-mRNAs y en la regulación de la respuesta a las temperaturas bajas. La primera en ser identificada fue STABILIZED 1 (STA1), que es homóloga de uno de los constituyentes del espliceosoma en humanos y levaduras (Lee y col., 2006). En el mutante *sta1-1*, cuando es expuesto a 0°C, se genera más de un transcrito de *COR15A*, producto de un *splicing* defectuoso y se produce una mayor estabilización de diferentes transcritos de respuesta a estrés (Lee y col., 2006). La segunda es una RNA helicasa, REGULATOR OF CBF GENE EXPRESSION 1 (RCF1), que también es homóloga de un componente del espliceosoma de eucariotas. *RCF1* se coexpresa junto con *STA1* y *BRR2B*, que codifica otra RNA helicasa del espliceosoma. Análisis genéticos han revelado que *RCF1*, *STA1* y *BRR2B* son reguladores positivos de la tolerancia a la congelación, pese a regular negativamente la expresión de *CBF2* (Guan y col., 2013). Los análisis transcriptómicos de los mutantes *rcf1* y *sta1* muestran alteraciones de la expresión génica y también defectos en el *splicing* en respuesta a temperaturas bajas (Ben Chaabane y col., 2013; Guan y col., 2013). Sin embargo, ninguno de los defectos de *splicing* identificados y comprobados en *rcf1* se ha detectado en *sta1* ni en *brr2b*, lo que sugiere que cada proteína regula de forma específica el *splicing* de diferentes poblaciones de mRNAs durante el proceso de aclimatación (Guan y col., 2013).

Los pre-mRNAs pueden sufrir, además, *splicing* alternativo y generar diferentes transcritos funcionales. Análisis transcriptómicos globales en *Arabidopsis* han puesto de manifiesto que, en respuesta a las temperaturas bajas, se producen cambios en los patrones de *splicing* de algunos transcritos (Iida y col., 2004; Filichkin y col., 2009; Leviatan y col., 2013). El análisis más reciente muestra que más de 200 genes varían su patrón de *splicing* tras la exposición a 4°C, pero solo la expresión de un 25% de ellos está regulada por frío (Leviatan y col., 2013). Las proteínas ricas en serina y arginina (SR) son reguladores del *splicing* alternativo y están codificadas por genes cuyos pre-mRNAs, a su vez, sufren *splicing* alternativo. Cinco genes de los 19 que codifican proteínas SR en *Arabidopsis* (*SR1/SR34*, *SR34b*, *RS31*, *RS40* y *SR33/SCL33*) sufren variaciones en la abundancia de sus transcritos alternativos tras la exposición a temperaturas bajas (Palusa y col., 2007), pero todavía no se conoce su papel en la regulación de dicha respuesta. Por el contrario, si que se conoce el de algunos eventos de *splicing* alternativo que se producen en varios factores de transcripción en respuesta a frío (Seo y col., 2013). Estos eventos, además de generar diversidad proteica, parece que pueden regular la actividad de los factores de transcripción por inhibición competitiva por interferencia de péptidos pequeños (Seo y col., 2013). Un ejemplo son los transcritos alternativos que se producen en el componente

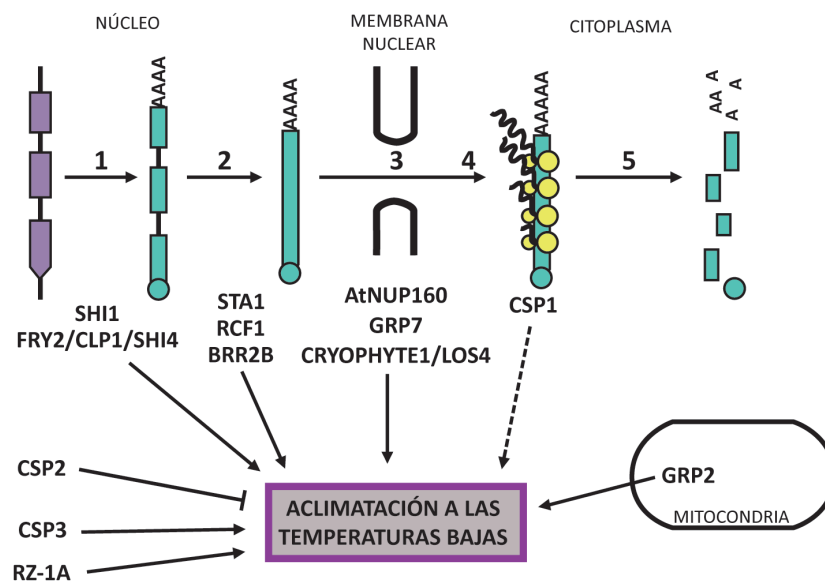


Figura 4. Representación esquemática de la regulación postranscripcional durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

Se indican las diferentes proteínas que han sido relacionadas con la regulación postranscripcional de la respuesta de aclimatación, así como su localización subcelular, si se conoce. Se representan los procesos desde la transcripción hasta la degradación del mRNA: (1) adición de la caperuza y poliadenilación, (2) *splicing*, (3) exportación del núcleo al citoplasma, (4) unión a los polisomas y (5) degradación. Las líneas acabadas en flecha o en líneas transversales indican regulación positiva o negativa, respectivamente. Las líneas continuas o discontinuas indican rutas demostradas o teóricas, respectivamente.

del reloj circadiano de *Arabidopsis* CCA1 que regula positivamente el proceso de aclimatación (Dong y col., 2011). El gen CCA1 produce dos transcritos, CCA1 α y CCA1 β . Este último, más corto y sin el dominio de unión a DNA, se traduce a una proteína capaz de dimerizar competitivamente con CCA1 α , inhibiendo su actividad (Seo y col., 2012). En respuesta a temperaturas bajas, la producción del transcrito CCA1 β es suprimida, de forma que se elimina la regulación negativa sobre CCA1 α , permitiendo la expresión de los CBFs y el desarrollo del proceso de aclimatación (Seo y col., 2012).

En *Arabidopsis*, se han caracterizado 3 mutantes en los que está afectada la exportación de mRNAs del núcleo al citoplasma y la capacidad de aclimatar (Gong y col., 2005; Dong y col., 2006a; Kim y col., 2008). El primero que se caracterizó fue *low expression of osmotically responsive gene 4-1* (*los4-1*) que muestra una menor inducción de los CBFs y es incapaz de aclimatar (Gong y col., 2002). *LOS4* codifica una RNA helicasa para la que se ha identificado un segundo alelo, *cryophyte/los4-2*, en el que, sorprendentemente, la inducción de CBF2 es mayor que en el WT y presenta mayor capacidad de aclimatar (Gong y col., 2005). La exportación de mRNAs al citoplasma solo está afectada en el alelo *los4-1*, lo que sugiere

que LOS4, además de facilitar la salida del núcleo a los mRNAs, tiene alguna otra función en la respuesta de Arabidopsis a las temperaturas bajas (Gong y col., 2005). En el mutante *atnup160* de Arabidopsis la inducción de los CBFs por frío es menor que en las plantas WT y muestra menor capacidad de aclimatación (Dong y col., 2006a). *AtNUP160*, codifica una nucleoporina que controla la salida de mRNAs del núcleo, principalmente en frío (Dong y col., 2006a). La exportación de los mRNAs al citoplasma durante la exposición a frío también está afectada en el mutante *grp7* de Arabidopsis (Kim y col., 2008). GRP7, como ya se ha mencionado anteriormente, regula positivamente la tolerancia constitutiva a la congelación (Kim y col., 2008).

Desde hace tiempo, se conocen transcritos cuya acumulación en respuesta a las temperaturas bajas está regulada postranscripcionalmente (Hajela y col., 1990; Wolfrum y col., 1993; Dunn y col., 1994). En el caso del transcrito *BTL4.0* de cebada, su estabilización es dependiente de un factor proteico nuclear (Phillips y col., 1997). En el caso del transcrito *TOUCH 4 (TCH4)* de Arabidopsis, se ha identificado una secuencia en su región 5' no traducida (5'UTR) responsable de su estabilización (Iliev y col., 2002). Recientemente, un estudio en Arabidopsis en el que se ha evaluado la vida media de los transcritos tras la parada de la transcripción con cordicepina en condiciones de frío, ha desvelado que se producen cambios globales en la vida media de los transcritos en respuesta a dichas condiciones (Chiba y col., 2013). Sin embargo, no se han identificado todavía factores que regulen la degradación de mRNAs durante el proceso de aclimatación.

1.1.2.3. Regulación traduccional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas

De manera generalizada, en condiciones de estrés se produce una inhibición de la traducción para reducir el consumo de energía y solo los mRNAs que participan en los procesos de respuesta escapan a este bloqueo traduccional (Echevarría-Zomeño y col., 2013). Recientemente, se ha descrito que la proteína CSP1 de Arabidopsis, una chaperona de RNA, ayuda a una población concreta de mRNAs a unirse a los polisomas para ser traducidos en condiciones de temperaturas bajas (Figura 4) (Juntawong y col., 2013). Esto sugiere que este tipo de proteínas de unión a RNA podrían ser las que especifican que mRNAs van a ser traducidos con mayor eficacia durante el proceso de aclimatación. Un mecanismo conservado en plantas para inhibir la traducción se produce al inicio de la traducción, mediante la fosforilación del factor de iniciación eIF2 (Muñoz y Castellano, 2012). Hasta el momento, solo se ha identificado una quinasa de Arabidopsis, GENERAL CONTROL NON-REPRESSIBLE 2 (GCN2), que es capaz de fosforilar rápidamente a eIF2 tras la exposición a 4°C (Lageix y col., 2008). No obstante, todavía no se ha establecido como afecta la ausencia de GCN2 al desarrollo del proceso de aclimatación. Por otro lado, se ha caracterizado un factor de elongación de la traducción en Arabidopsis, LOW EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1 (LOS1), que regula positivamente el desarrollo

de esta respuesta adaptativa en *Arabidopsis* (Guo y col., 2002).

1.1.2.4. Regulación postraducciona de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas

Se ha descrito que varios componentes de las rutas de transducción de la señal que median la respuesta a las temperaturas bajas están regulados mediante modificaciones postraduccionales (Figura 5) (Barrero-Gil y Salinas, 2013).

La fosforilación es una de las modificaciones postraduccionales más comunes para regular la función proteica. Análisis globales de fosforilación de proteínas en alfalfa, antes y después de la exposición a frío, muestran importantes diferencias, lo que indica cambios en la actividad tanto de proteína quinasas como de proteínas con actividad fosfatasa durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Monroy y col., 1993; Monroy y col., 1997). Ya se ha comentado previamente, como proteínas sensoras de Ca^{2+} que interaccionan con quinasas (CIPK), o con actividad quinasa propia, participan en la regulación de esta respuesta adaptativa. Además, existen otras proteína quinasas encargadas de transmitir la señal como son las proteína quinasas activadas por mitógenos (MAPKs). Existen tres tipos de MAPKs, MAPK, MAPKK y MAPKKK, que transmiten la señal por fosforilación secuencial (MAPKKK→MAPKK→MAPK) al último componente de la cascada (MAPK) que a su vez fosforila a proteínas efectoras. En plantas, se han identificado genes inducibles por temperaturas bajas que codifican distintos tipos de MAPKs. Mizoguchi y col. (1996) demostraron la inducción transitoria de *AtMEKK1* y *AtMPK3*, que codifican una MAPKKK y una MAPK, respectivamente, minutos después de exponer plantas de *Arabidopsis* a 4°C. También se ha caracterizado una cascada de MAPKs implicada en la regulación del proceso de aclimatación de *Arabidopsis*, que está compuesta por MEKK1 (MAPKKK), MKK2 (MAPKK), y MPK4 y MPK6 (MAPKs) (Teige y col., 2004). Análisis genéticos han permitido demostrar que MKK2 regula positivamente la tolerancia a la congelación (Teige y col., 2004). Además, MKK2 aumenta su actividad en respuesta a frío, aumentando a su vez la actividad de MPK4 y MPK6, y controlando la inducción de genes de respuesta a estrés (Teige y col., 2004). Así mismo, se han identificado algunas de las posibles proteínas diana de MPK4 y MPK6, entre las que cabe destacar factores de transcripción como ICE1, CBF1, CBF3 y MYB15 (Popescu y col., 2009). Estos resultados revelan una conexión entre las cascadas de fosforilación y la regulación transcripcional del proceso de aclimatación (Figura 5).

En cuanto a la actividad proteína fosfatasa, se ha puesto de manifiesto que la inhibición de la PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2A), una serina treonina fosfatasa, es necesaria para la inducción de algunos genes inducibles por frío en *Arabidopsis* y alfalfa (Monroy y col., 1998; Luo y col., 2006). Sin embargo, todavía no se ha podido demostrar la implicación de esta fosfatasa en el desarrollo del proceso de aclimatación. La PROTEIN PHOSPHATASE 2CA (PP2CA) de *Arabidopsis*, por otra parte, actúa regulando negativamente esta

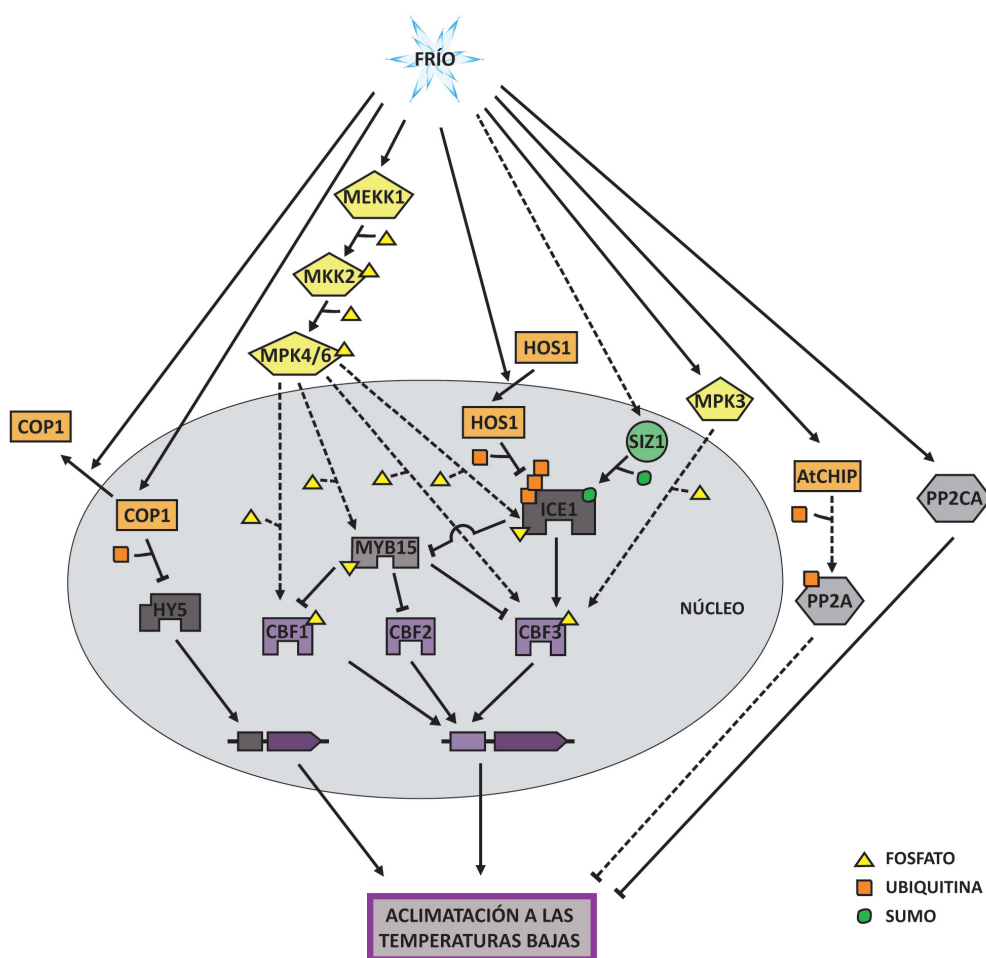


Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos postraduccionales implicados en la regulación del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

Las proteínas quinasas, proteínas fosfatasa, y las ligasas E3 de ubiquitina y SUMO interactúan con proteínas modificándolas, cambiando su estabilidad o actividad, y contribuyendo a la reprogramación del transcriptoma durante la respuesta de aclimatación. La convergencia de varios tipos de modificaciones postraduccionales en ICE1 muestra la complejidad que puede alcanzar este tipo de regulación para que se produzca el correcto desarrollo del proceso de aclimatación. Las modificaciones postraduccionales pueden afectar también a otros componentes de las rutas de señalización que median esta respuesta adaptativa, como es el caso de la PP2A. La incorporación de triángulos amarillos, cajas naranjas o círculos verdes, representa la adición de un grupo fosfato, ubiquitina o SUMO, respectivamente. Las líneas acabadas en flecha o en líneas transversales indican regulación positiva o negativa, respectivamente. Las líneas continuas o discontinuas indican rutas demostradas o teóricas, respectivamente.

respuesta adaptativa (Figura 5) (Tähtiharju y Palva, 2001). Dado que *PP2CA* se induce en respuesta a temperaturas bajas, se ha propuesto que actúa en la retroalimentación negativa del proceso de aclimatación (Tähtiharju y Palva, 2001). Otra fosfatasa implicada en este proceso es *FRY2/CPL1/SHI4*, que junto con *SHI1*, como ya se ha mencionado (Sección 1.1.2.2), modula la maduración de mRNAs defosforilando el dominio C-terminal

de la RNA polimerasa II e inhibiendo su actividad (Figura 4) (Koiwa y col., 2002; Koiwa y col., 2004). Así pues, la transducción de la señal de frío modula la fosforilación y defosforilación de proteínas específicas para que pueda desarrollarse correctamente el proceso de aclimatación.

Otro mecanismo molecular implicado en la regulación postraducciona del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas es la ubiquitinación, consistente en la unión del péptido ubiquitina a residuos de lisina de las proteínas diana. La unión de la ubiquitina es llevada a cabo por tres enzimas, siendo las ligasas E3 de ubiquitina las que aportan la especificidad. La primera ligasa E3 de ubiquitina relacionada con la aclimatación a las temperaturas bajas fue HIGH EXPRESSION OF OSMOTICALLY RESPONSIVE GENE 1 (HOS1), una ligasa de *Arabidopsis* con dominio RING (Dong y col., 2006b). En respuesta a frío, HOS1 disminuye la estabilidad del activador transcripcional ICE1, regulando negativamente la expresión de *CBF3* y sus genes diana, lo que sugiere que HOS1 actúa atenuando el proceso de aclimatación (Figura 5) (Ishitani y col., 1998; Dong y col., 2006b). CONSTITUTIVELY PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) es otra ligasa E3 de ubiquitina de *Arabidopsis* con dominio RING que ha sido implicada en la regulación negativa de esta respuesta adaptativa (Catalá y col., 2011). COP1 actúa interaccionando y ubiquitinando el factor transcripcional HY5, que es un regulador positivo de la aclimatación (Catalá y col., 2011). En condiciones de frío, COP1 es excluido del núcleo, impidiendo la ubiquitinación de HY5, que de esta forma aumenta su estabilidad promoviendo la activación transcripcional y el desarrollo del proceso de aclimatación (Figura 5) (Catalá y col., 2011). También se ha identificado en *Arabidopsis* el gen *CARBOXYL TERMINUS OF HSC70-INTERACTING PROTEIN* (*AtCHIP*), que codifica una ligasa E3 de ubiquitina con dominio *U-box*, cuya expresión se induce en respuesta a las temperaturas bajas (Yan y col., 2003). En estas condiciones, *AtCHIP* monoubiquitinaría una subunidad de la fosfatasa PP2A, aumentando su actividad (Luo y col., 2006). Como ya se ha mencionado, PP2A podría ser un regulador negativo de la respuesta a las temperaturas bajas, lo que sugiere que *AtCHIP* también podría actuar como regulador negativo del proceso de aclimatación (Figura 5).

La SUMOilación es otra modificación postraducciona implicada en la regulación del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Mediante la SUMOilación, el polipéptido SUMO interacciona con residuos de lisina de las proteínas diana a través de la participación de 3 enzimas ligasas. SAP AND MIZ 1 (SIZ1) es una ligasa E3 de SUMO de *Arabidopsis* (Miura y col., 2005) que se ha identificado como la responsable del aumento de SUMOilación que tiene lugar en respuesta a frío (Miura y col., 2007). SIZ1 actúa como regulador positivo del proceso de aclimatación, lo que indica que la SUMOilación participa en la regulación de esta respuesta adaptativa (Miura y col., 2007). SIZ1 cataliza la SUMOilación del activador transcripcional ICE1 (Miura y col., 2007), y experimentos *in vitro* indican que la SUMOilación de ICE1 puede reducir sus niveles de ubiquitinación, aumentando su estabilidad (Miura y col., 2007). Se ha propuesto un modelo en el que se integran las actividades de HOS1, SIZ1 y ICE1 en la regulación de la expresión génica

durante la respuesta de aclimatación a las temperaturas bajas (Miura y col., 2007). En condiciones control, HOS1 estaría ubiquitinando a ICE1, promoviendo su degradación por el proteasoma. La disminución de la temperatura reprimiría la expresión de *HOS1* y activaría a *SIZ1*, lo que conllevaría una disminución del grado de ubiquitinación de ICE1, permitiendo su acumulación. ICE1 podría así inducir la expresión de *CBF3* directamente, así como la de los otros *CBFs* mediante la represión de *MYB15* (Figura 5).

1.2. Las proteínas LSMs

Las proteínas LIKE-SM (LSMs) son miembros de una gran familia implicada en el metabolismo del RNA. La importancia de las LSMs queda reflejada en el hecho de que se encuentran presentes, además de en organismos eucariotas, en bacterias y arqueobacterias, y se piensa que ya estaban presentes en el último ancestro común universal (LUCA) (Anantharaman y col., 2002). Los primeros miembros se identificaron como los antígenos de los anticuerpos autoinmunes de pacientes con Lupus Eritematoso Sistémico, y recibieron su nombre, Sm, de una paciente (Tan y Kunkel, 1966). Posteriormente, los antígenos fueron identificados como los componentes proteicos de las ribonucleoproteínas pequeñas nucleares (snRNPs) (Lerner y Boyle, 1981) que están caracterizadas por la presencia de un dominio que se denominó SM (Hermann y col., 1995). Es la presencia de este dominio, formado por dos motivos, Sm1 y Sm2, separados por una región variable, lo que define a todas las proteínas de la familia que se denominó LSM. Además, el dominio SM les permite interactuar entre ellas para formar anillos hexaméricos o heptaméricos con capacidad de unir RNAs de cadena sencilla (Achse y col., 1999; Kambach y col., 1999; Zaric y col., 2005; Zhou y col., 2014).

En humanos y levaduras, se han descrito 3 complejos principales de proteínas LSMs que se diferencian por las proteínas que los constituyen, por su localización subcelular y por los RNAs con los que interactúan (Figura 6) (Khusial y col., 2005). El primero en ser identificado fue el formado por las siete proteínas Sm identificadas originalmente (SmB/B', SmD1, SmD2, SmD3, SmE, SmF y SmG) (Hinterberger y col., 1983; Bringmann y Lührmann, 1986). Este complejo es de localización nuclear e interactúa con los RNAs pequeños nucleares (snRNAs) U1, U2, U4 y U5 (Hinterberger y col., 1983; Bringmann y Lührmann, 1986). Posteriormente, se identificaron 8 proteínas adicionales con motivos Sm que se denominaron LSM1 a LSM8 (Cooper y col., 1995; Séraphin, 1995). Estas proteínas LSMs forman dos complejos diferentes (Khusial y col., 2005). Uno de ellos está formado por las proteínas LSM2 a LSM8, es de localización nuclear y estabiliza el U6 snRNA con el que forma parte del espliceosoma (Achse y col., 1999; Mayes y col., 1999; Salgado-Garrido y col., 1999; Zhou y col., 2014). El otro complejo lo forman las proteínas LSM1 a LSM7, se localiza en el citoplasma, e interactúa con mRNAs marcándolos para su degradación (Bouveret y col., 2000; Tharun y col., 2000).

El papel del complejo LSM2-LSM8 ha sido estudiado en humanos y levaduras, en los

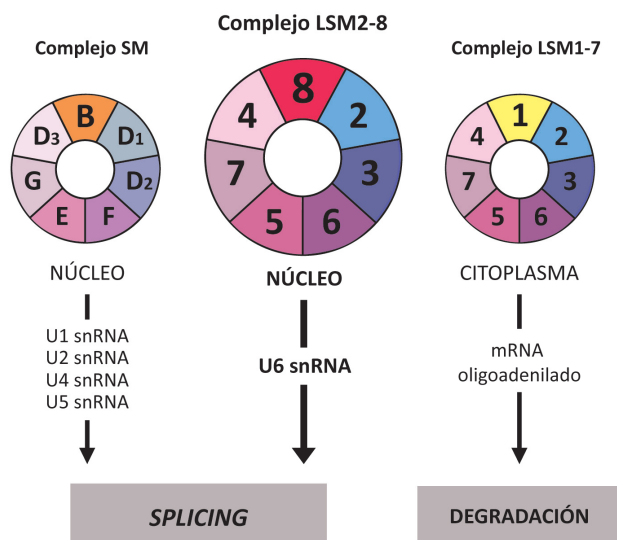


Figura 6. Complejos de proteínas LSMs.

Esquemas de los tres complejos principales de proteínas LSMs. Se indica para cada complejo el tipo de RNA con el que interactúa, así como la función principal de cada complejo.

que se observó que la falta de algunas de estas proteínas causaba un descenso específico en los niveles de U6 snRNA, y defectos en la eliminación de los intrones de los pre-mRNAs (Mayes y col., 1999; Salgado-Garrido y col., 1999). A diferencia del resto de los U snRNAs que forman parte del espliceosoma, la biogénesis del U6 snRNA se produce en su totalidad en el núcleo y es transcrito por la RNA polimerasa III (Kiss, 2004). La proteína La/Lhp1p interactúa con la cola 3' de poli U del U6 snRNA naciente, para estabilizarlo y facilitar la formación de la U6 snRNP al ser reemplazada por el complejo LSM2-LSM8 (Pannone y col., 1998). El espliceosoma se forma sobre cada intrón de forma secuencial y ordenada a partir de cada snRNP y otros cientos de proteínas (Figura 7) (Wahl y col., 2009). Durante el ensamblaje del espliceosoma, las snRNPs sufren cambios en su composición y estructura, siendo el mayor el que se produce en la U6 snRNP. Antes de incorporarse al preespliceosoma, la U6 snRNP forma complejos con la U4 snRNP (U4/U6 di-snRNP) y con la U5 snRNP (U4/U6.U5 tri-snRNP), y de esta forma entra a formar parte del preespliceosoma, en el que ya se encuentran las U1 y U2 snRNPs unidas al intrón que se va a eliminar del pre-mRNA. En la forma catalítica activa del espliceosoma, el U6 snRNA se asocia con el sitio de corte 5' y se aparea con el U2 snRNA para constituir el centro catalítico activo. Tras la reacción de *splicing*, el espliceosoma se disocia y se liberan las snRNPs individuales para iniciar una nueva ronda de *splicing*. El complejo LSM2-LSM8, durante todo este proceso permanece unido al U6 snRNA, estabilizándolo y facilitando que se produzcan todas las modificaciones e interacciones RNA-RNA y RNA-proteína, así como el reciclaje de la U6 snRNP (Beggs, 2005).

La importancia del complejo LSM2-LSM8 en la fisiología celular se refleja en los fenotipos que presentan los organismos en los que la función de alguna de las proteínas que lo forman se ve alterada. En levaduras, la delección de LSM8 es letal, y lo mismo ocurre

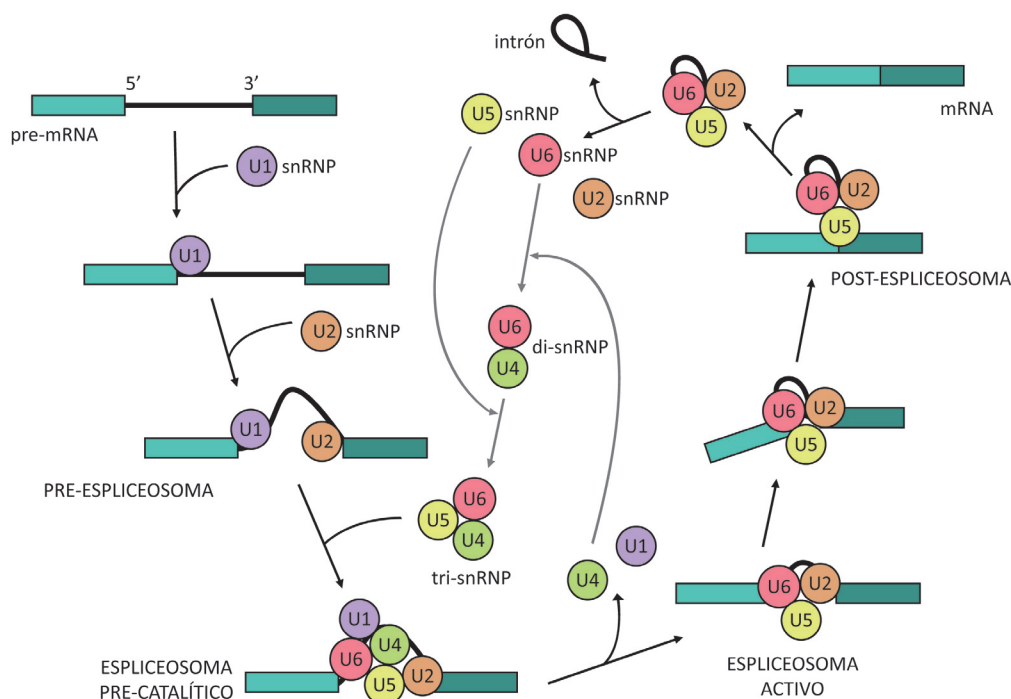


Figura 7. Esquema del ciclo de ensamblaje y desensamblaje de las snRNPs en el espliceosoma.

Se detalla el proceso de incorporación secuencial de las snRNPs para formar el espliceosoma y eliminar el intrón de un pre-mRNA con dos exones, así como el reciclaje de las snRNPs para iniciar la formación de otro espliceosoma. Se representan los complejos que se han aislado en mamíferos (Wahl y col., 2009). Las snRNPs, el intrón y los exones se representan mediante círculos de colores, una línea gruesa negra y cajas verdes, respectivamente.

con la delección de LSM2, LSM3, LSM4 y LSM5 (Cooper y col., 1995; Mayes y col., 1999). La delección de LSM6 y LSM7, por su parte, hace que las levaduras sean termosensibles (Mayes y col., 1999). En ratones, la disrupción de LSM4 es letal a nivel embrionario (Hirsch y col., 2000), mientras que en *Trypanosoma* se ha observado que tanto LSM3 como LSM8 son esenciales para la viabilidad celular (Liu y col., 2004).

En *Arabidopsis*, la comparación de secuencias con los componentes del espliceosoma de levaduras y humanos, permitió identificar 395 proteínas relacionadas con el *splicing* (Wang y Brendel, 2004). Más recientemente, este número ha aumentado a 430, aunque en muchos casos la relación con sus homólogos en levaduras y metazoos está basada únicamente en la conservación de ciertos dominios funcionales y requieren de verificaciones estructurales y funcionales (Koncz y col., 2012). Se han identificado homólogos de *Arabidopsis*, tanto para las proteínas Sms como para las proteínas LSMs (Wang y Brendel, 2004). Todas las proteínas Sms, así como la LSM3 y la LSM6, y la LSM1, que no forma parte del espliceosoma, están duplicadas (Wang y Brendel, 2004). La pérdida parcial de función del gen *LSM5* en *Arabidopsis* hace a las plantas hipersensibles a ABA y deshidratación (Xiong y col.,

2001b). También se ha identificado en *Arabidopsis* un mutante de *LSM4*, que presenta fenotipos de desarrollo severos y menor tolerancia a salinidad que se han relacionado con defectos en el splicing de un número limitado de genes (Zhang y col., 2011). La función de las proteínas LSM de *Arabidopsis* en el procesamiento de RNAs, sin embargo, no ha sido determinada hasta recientemente con nuestro trabajo y otros posteriores (Perea-Resa y col., 2012; Cui y col., 2014; Zhang y col., 2011).

1.3. Planteamiento de la tesis

A lo largo de esta Introducción se han puesto de manifiesto los complejos mecanismos moleculares que regulan la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Hasta hace poco tiempo, la mayoría de estudios y esfuerzos se habían concentrado en la caracterización de la regulación de la expresión génica a nivel transcripcional, y en cierta medida postraduccional. Actualmente, se están empezando a estudiar los mecanismos implicados en la regulación de la expresión génica a nivel postranscripcional. Como se ha expuesto, la caracterización de algunas proteínas implicadas en el procesamiento de mRNAs ha comenzado a revelar la existencia de una sofisticada red de regulación de la que todavía faltan muchos datos por conocer. En nuestro laboratorio, uno de los objetivos prioritarios es la identificación y caracterización de nuevos componentes de las vías de señalización que median el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Con este objetivo, se generó una genoteca de cDNAs inducibles por frío, a partir de la cual se identificaron una serie de genes, denominados *RARE COLD INDUCIBLE (RCI)* (Jarillo y col., 1994), cuya expresión se induce durante el proceso de aclimatación a niveles medio/bajos. Uno de estos genes, *RCI6*, resultó codificar una proteína homóloga a la LSM2 de distintos organismos eucariotas que como acabamos de ver, está implicada en el metabolismo de RNAs. Teniendo en cuenta que las proteínas LSMs de plantas no habían sido caracterizadas a nivel funcional, y el interés de la regulación postranscripcional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación, nos planteamos los siguientes objetivos para esta tesis:

1.4. Objetivos de la tesis

1º. Caracterizar funcionalmente el complejo LSM2-LSM8 de Arabidopsis

2º. Caracterizar la implicación del complejo LSM2-LSM8 de Arabidopsis en el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones de crecimiento

Todos los estudios se realizaron con plantas de la especie *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh del ecotipo Columbia-0 (WT). Para este trabajo se identificaron dos líneas mutantes de inserción de T-DNA en el gen *LSM8* (*AT1G65700*) denominadas *lsm8-1* y *lsm8-2*, que corresponden a las líneas Salk-025064 y Salk048010, respectivamente. Además, se utilizaron los mutantes *lsm4-1* (Zhang y col., 2011) y *lsm1a lsm1b* (Perea-Resa y col., 2012). Las plantas se genotiparon con los oligonucleótidos específicos para los extremos del T-DNA y para la secuencia genómica adyacente (Tabla I, Anexo I). La ausencia de expresión se comprobó mediante hibridaciones tipo *Northern* con sondas específicas (Tabla I, Anexo I). En todos los casos, los experimentos se realizaron con plantas con las inserciones de T-DNA en homocigosis.

Las plantas se crecieron en cámaras climáticas a 22°C, con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Las semillas se sembraron en superficie, sobre una mezcla de sustrato con vermiculita (3:1) que se humedeció y autoclavó antes de su utilización. Una vez sembradas, se colocaron en bandejas cubiertas con plástico transparente, con el fin de mantener la humedad y evitar contaminaciones durante la germinación, que se retiró una vez germinadas las semillas. Para el cultivo *in vitro*, las semillas se esterilizaron previamente con solución de esterilizar semillas (Sección 2.13) durante 10 minutos y se lavaron con agua estéril 5 veces. Una vez sembradas las semillas las placas de Petri se sellaron con cinta *Micropore*. Tras la siembra, en todos los casos, las semillas se estratificaron en oscuridad a 4°C durante 48 horas y posteriormente se sacaron a crecer en las condiciones mencionadas.

2.2. Análisis de fenotipos de desarrollo

Para determinar el tiempo de germinación, se utilizaron semillas recolectadas simultáneamente de plantas crecidas en las mismas condiciones y que habían permanecido almacenadas los mismos periodos de tiempo. Se sembraron semillas de cada genotipo en diferentes secciones de placas de Petri con medio Murashige y Skoog (MS) (Sección 2.12). Tras la estratificación se sacaron a crecer y se contaron diariamente las germinadas. Se consideraron como germinadas las semillas en las que habían emergido los cotiledones, y estaban verdes y expandidos. Se realizaron 3 réplicas biológicas con 3 réplicas técnicas cada una con un mínimo de 50 semillas cada una por genotipo.

Los fenotipos de los cotiledones se examinaron en plántulas procedentes de semillas de plantas crecidas en las mismas condiciones y recolectadas al mismo tiempo. Una vez germinadas las plántulas en placas de Petri con medio MS, se identificaron plántulas con anomalías en el número o la forma de los cotiledones y se cuantificaron sobre el total de las plántulas germinadas. Se utilizaron un mínimo de 500 plántulas por genotipo. El análisis de los patrones vasculares de los cotiledones se realizó con plántulas de 12 días crecidas

en placas de Petri con medio MS. Se clarificaron las plántulas con etanol 70% durante 24 horas y se observaron a la lupa, sobre fondo oscuro, montadas en glicerol al 50%. Los datos se obtuvieron de 3 réplicas biológicas con 20 plantas por genotipo cada una.

La longitud de los peciolo se midió en los de la primera y segunda hojas verdaderas de plántulas de 10 días crecidas en placas de Petri con medio MS. Se cortaron las hojas por la base del peciolo y se tomaron imágenes digitales sobre las que se realizaron las medidas con el programa *ImageJ*. Los datos se obtuvieron de un mínimo de 25 peciolo por genotipo.

Los tamaños de la roseta y las hojas se midieron en plantas crecidas en tierra. La roseta se midió en plantas de 25 días de las cuales se tomaron imágenes digitales sobre las que se midieron las áreas circulares con el programa *ImageJ*. Los datos se obtuvieron de 25 plantas por genotipo. Las medidas de las hojas se realizaron sobre las tercera y cuarta hojas de plantas de 15 días, tomando imágenes de las hojas extendidas. El área se midió dibujando el área de la hoja sobre la imagen digital con el programa *ImageJ*. Las medidas se realizaron en un mínimo de 20 plantas por genotipo.

Los análisis de las raíces se realizaron con plántulas de 11 días crecidas en medio MS dentro de placas de Petri cuadradas y colocadas en vertical. Tras 5 días, las plantas se transfirieron a una placa nueva con MS, en una sola línea, a 2cm de la parte superior, y espaciadas de forma homogénea. A los 11 días se tomaron imágenes digitales sobre las que se realizaron las medidas de longitud de la raíz principal y número de raíces secundarias con el programa *ImageJ*. Los datos se obtuvieron de 3 réplicas biológicas con un mínimo de 20 plantas por genotipo cada una.

La longitud de las silicuas se midió en la sexta y la séptima silicua del tallo principal de plantas de 6 semanas de edad. Las silicuas se cortaron y se tomaron imágenes digitales sobre las que se realizaron las medidas con el programa *ImageJ*. Se midieron un mínimo de 25 silicuas por genotipo. El número de semillas por silicua se contó, también, en la sexta y séptima silicua de plantas de 6 semanas, separando las dos valvas con la ayuda de pinzas bajo el microscopio. Los datos se obtuvieron de un mínimo de 20 silicuas por genotipo.

El tiempo de floración se cuantificó, tanto en día largo (16 horas de luz / 8 horas de oscuridad) como en día corto (8 horas de luz / 16 horas de oscuridad), como el número de hojas totales, de la roseta y caulinares, en el momento de la floración, que se definió como el momento en el que el tallo principal tenía 1cm. La cuantificación se realizó para un mínimo de 24 plantas por genotipo en cada fotoperiodo.

2.3. Tratamientos experimentales

Los tratamientos para analizar la expresión génica se aplicaron a plantas de 2 semanas crecidas en tierra y se comenzaron 1 hora después del inicio el periodo diurno (ZT1). Los tratamientos de frío se realizaron poniendo las plantas a 4°C, en las mismas condiciones de iluminación. A los tiempos indicados se recogió el material, que fue congelado en nitrógeno líquido y guardado a -80°C hasta su utilización.

Para analizar la tolerancia a las temperaturas de congelación de los mutantes *lsm8*, se utilizaron plantas de 2 semanas crecidas en tierra. Para aclimatar las plantas, tras las 2 semanas a 22°C se pusieron 7 días a 4°C, en las mismas condiciones de día largo. El tratamiento se inició siempre por la tarde y comenzó con una hora a 4°C, a la que le siguió una rampa de bajada de 1°C cada media hora hasta llegar a la temperatura de congelación seleccionada. Tras 5 horas a dicha temperatura, esta se subió hasta 4°C con una rampa igual a la de bajada, manteniéndose otra hora a 4°C, tras la cual las plantas se retornaron a la cámara de cultivo. Después de una semana de recuperación en condiciones óptimas se contaron las plantas supervivientes.

2.4. Análisis de la expresión génica

2.4.1. Análisis mediante hibridaciones tipo *Northern*

El RNA total utilizado para las hibridaciones tipo *Northern* se extrajo por el método del hidrocloreto de guanidina descrito por Logemann (1987) y se cuantificó con un espectrofotómetro *Nanodrop* (*Thermo Scientific*). Los RNAs se mezclaron con 15 µl de tampón de carga (Sección 2.13), y se desnaturalizaron a 65°C durante 5 minutos. Las muestras desnaturalizadas fueron cargadas en un gel desnaturalizante (agarosa al 1,5% en tampón MOPS 1X y formaldehído al 16%) y se separaron a 80 V, durante aproximadamente 2 horas. Los RNAs se transfirieron a membranas de nylon *Hybond XL* (*Amersham Biosciences*) por capilaridad, utilizando NaOH 0,05 M, durante 16 horas. Las membranas se lavaron con SSC 2X y se guardaron a temperatura ambiente hasta el momento de su utilización.

Las sondas de DNA para las hibridaciones se obtuvieron mediante PCR con los oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla I, Anexo I) y se purificaron con el equipo *Qiaquick* (*Qiagen*) tras su separación en geles de agarosa. El marcaje de las sondas se realizó con 30 µCi de α -³²P-dCTP por el método de extensión a partir de oligonucleótidos al azar con el equipo *Megaprime DNA Labelling Systems* (*Amersham Biosciences*). En el caso de las sondas para los genes *LSMs*, se sustituyeron los oligonucleótidos al azar por los específicos para amplificar las sondas, aumentando así la cantidad de dCTP marcado que se incorporaba. Los nucleótidos no incorporados se eliminaron mediante cromatografía de exclusión molecular, con columnas *MicroSpin S-200 HR* (*Amersham Biosciences*). Las hibridaciones se llevaron a cabo en tubos de vidrio con 5 ml de tampón de Church (Sección

2.13), con el que se prehibridaron las sondas durante 2 horas. Posteriormente se añadió la sonda marcada y desnaturalizada a 100°C durante 5 minutos, con la que se mantuvieron un mínimo de 16 horas. Una vez hibridadas, las membranas se lavaron con una solución de SDS 0,5% y SSPE 5X. La exposición se realizó sobre películas de autorradiografía *High Performance Autoradiography Film* (Amersham Biosciences) en cajas de exposición *Hypercassette* (Amersham Biosciences) con pantallas intensificadoras (Amersham Biosciences) a -80°C durante tiempos variables, tras lo cual se procedió al revelado. En todos los casos se realizaron al menos 3 hibridaciones con 3 réplicas biológicas independientes.

2.4.2. Análisis mediante PCR cuantitativa a tiempo real

El RNA se extrajo con *Purezol* (Bio-Rad), siguiendo las instrucciones del fabricante, y se realizó un tratamiento con DNasa I (Roche) a 37°C durante 15 minutos, para eliminar los restos de DNA genómico. Los RNAs se cuantificaron con un espectrofotómetro *Nanodrop* (Thermo Scientific), y se comprobó su integridad en un gel de agarosa desnaturalizante visualizándolos con bromuro de etidio (EtBr). Los cDNAs se obtuvieron con el equipo *iScript cDNA synthesis* (Bio-Rad) y se amplificaron con *SsoFast EvaGreen Supermix* (Bio-Rad) y oligonucleótidos específicos para cada gen (Tabla I, Anexo I), en un termociclador Bio-Rad iQ2. La expresión relativa se determinó mediante el cálculo de ΔCt , utilizando el gen *AT4G26410* como referencia (Czechowski y col., 2005). La cuantificación se realizó siempre por triplicado con tres réplicas biológicas independientes.

2.4.3. Análisis transcriptómico con micromatrices de genoma completo

Los análisis transcriptómicos se realizaron con RNA total de plantas WT y *lsm8-1* de 2 semanas, crecidas en condiciones control o expuestas a 4°C durante 24 horas. Para cada muestra se obtuvieron 9 réplicas biológicas independientes con las que se hibridaron 3 micromatrices. La extracción de RNA total para la hibridación de las micromatrices se realizó con el equipo *RNeasy* (Qiagen). La hibridación de las micromatrices se llevó a cabo en el Servicio de Genómica del CNB-CSIC, donde sintetizaron, procesaron y marcaron cDNAs de doble cadena con el equipo *GeneChip Whole Transcript Double-Stranded Target Assay* (Affymetrix). Con los cDNA de doble cadena marcados hibridaron las micromatrices *Affymetrix Arabidopsis Tiling 1.0R*. Los datos se analizaron con el *Tiling Analysis Software* (Affymetrix) usando la anotación TAIR7 del genoma de Arabidopsis.

Los genes con expresión desregulada en el mutante *lsm8-1* se detectaron mediante la identificación de exones con expresión significativamente mayor o menor que en el WT. Estos exones eran aquellos con más de la mitad de las sondas con una señal 2 veces mayor o menor y un valor de P menor de 0,05. Una vez identificados los exones diferencialmente expresados, se calculó la expresión del gen correspondiente mediante la media corregida (10%) de todas las sondas de todos los exones y las regiones no traducidas (UTRs). Se consideró que un gen tenía mayor o menor expresión en el mutante *lsm8-1* que en el WT,

si la media era 2 veces mayor o menor en el mutante, respectivamente. Para los genes con variantes de *splicing* solo se tuvieron en cuenta los exones constitutivos en los modelos génicos descritos en la anotación de referencia (TAIR7).

Los intrones retenidos en el mutante *lsm8-1* se determinaron mediante la identificación de aquellos intrones con una señal significativamente mayor en el mutante respecto al WT. Para aumentar la fiabilidad solo se tuvieron en cuenta los intrones con un mínimo de tres sondas. Se identificaron aquellos intrones en los que más de la mitad de sus sondas tenían una señal 2 veces mayor y un valor de P menor de 0,05. Para considerar un intrón como retenido en el mutante *lsm8-1* el cálculo de la media de las señales de todas las sondas del intrón debía ser al menos 2 veces mayor en el mutante que en el WT. Solo se tuvieron en cuenta aquellos intrones constitutivos, es decir, que no se retenían en ninguno de los modelos génicos descritos en la anotación de referencia (TAIR7).

2.5. Comprobación de retención de intrones

La extracción de RNA total y la síntesis de cDNAs se llevo a cabo igual que para la RT-PCR cuantitativa (qRT-PCR). La comprobación se realizó mediante PCR utilizando los cDNAs como moldes (+RT) y oligonucleótidos específicos para cada intrón (Tabla I, Anexo I). Uno de los oligonucleótidos se situó dentro de la secuencia del intrón retenido y el otro en uno de los exones adyacentes. Como control de posibles contaminaciones de DNA genómico, se realizaron PCRs con RNA total sin retrotranscribir como molde (-RT). Como control positivo de la reacción, se utilizó DNA genómico como molde. La expresión del gen *TUBULINA* (*TUB*) se utilizó como control de carga. Los resultados se visualizaron en geles de agarosa al 2% con EtBr. Los experimentos se realizaron siempre por triplicado con 3 réplicas biológicas independientes.

2.6. Análisis de estabilidad de RNAs

Para los análisis de estabilidad de RNAs se realizaron tratamientos con el inhibidor de la transcripción 3'-deoxyadenosina (cordicepina) (Abler y Green, 1996). Las plántulas se crecieron en placas con medio MS, en vertical, y a los 6 días se transfirieron a placas multipocillo con el tampón de incubación (Sección 2.13) (Seeley y col., 1992). Las incubaciones se llevaron a cabo con agitación en una cámara de cultivo. A los 30 minutos del inicio, se añadió la cordicepina a una concentración final de 150 μ M, y se tomó la muestra control a tiempo 0. Se recogieron las muestras a los tiempos indicados, y a las 9 y 24 horas se añadió más cordicepina para mantener la inhibición de la transcripción. La extracción de RNAs y las hibridaciones tipo *Northern* se realizaron tal y como se ha descrito para el análisis de la expresión génica. En todos los casos, los experimentos se realizaron por triplicado con 3 réplicas biológicas independientes.

2.7. Estudios de microscopía

En todos los casos las muestras se montaron con glicerol 50% en los portaobjetos, y tras colocar los cubreobjetos se sellaron con laca de uñas. Los haces vasculares de los cotiledones se analizaron con una lupa *Nikon SMZ-2T*, y las imágenes se capturaron con una cámara *Nikon Digital Sight DS-U1*. Las observaciones y la captura de imágenes de localización subcelular y complementación bimolecular de la fluorescencia (BiFC) se realizaron con un microscopio confocal *Leica TCS SP2* (*Leica Microsystems*).

2.7.1. Localización subcelular

Para expresar las proteínas de fusión a GREEN FLUORESCENT PROTEIN (GFP) se generaron plantas transgénicas estables con las construcciones *LSM8_{pro}-LSM8-GFP* y *LSM4_{pro}-LSM4-GFP*. Se clonó al menos 1 kb de la secuencia promotora y la secuencia genómica de *LSM8* y *LSM4* con oligonucleótidos específicos (Tabla I, Anexo I) mediante el sistema de clonaje *Gateway* en el vector binario pGWB4. Las plantas WT se transformaron por el método de inmersión floral descrito por Clough y Bent (1998) con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Deblaere y col., 1985). La determinación de la localización subcelular de las proteínas de fusión *LSM8-GFP* y *LSM4-GFP* se realizó en raíces de las plántulas transgénicas de 6 días de edad crecidas en vertical en medio MS.

La funcionalidad de las construcciones *LSM8_{pro}-LSM8-GFP* y *LSM4_{pro}-LSM4-GFP* se comprobó mediante la complementación de los mutantes *lsm8-1* y *lsm4-1*, respectivamente. Las plantas mutantes *lsm8-1* y plantas heterocigotas para la inserción en el gen *LSM4*, se transformaron con las construcciones correspondientes, y se comprobó la recuperación de los fenotipos WT en las descendencias.

2.7.2. Complementación bimolecular de la fluorescencia

Para realizar los ensayos de BiFC, se clonaron los cDNAs correspondientes a las proteínas LSMs amplificándolos con oligonucleótidos específicos (Tabla I, Anexo I) que incorporaban los sitios de restricción necesarios para el clonaje en los vectores binarios pSPYNE-35S y pSPYCE-35S (Walter y col., 2004). Las construcciones se transformaron en la cepa de *A. tumefaciens* C58C1 (Deblaere y col., 1985) con la que se agroinfiltraron hojas de *Nicotiana benthamiana* de 3 semanas de edad, según el método descrito por English y col. (1997). Las observaciones se llevaron a cabo 3 días tras la agroinfiltración.

2.8. Extracción de DNA

2.8.1. Extracción de DNA genómico de Arabidopsis

La extracción de DNA genómico que se empleo como molde para la obtención de sondas e insertos de los clonajes se realizó mediante el método descrito por Ceniz (1992).

2.8.2. Extracción de DNA plasmídico de *Escherichia coli*

El aislamiento de DNA plasmídico se realizó por el método de lisis alcalina (Birnboim y Doly, 1979) o con el equipo *High Pure Plasmid* (Roche) cuando se necesitó mayor pureza.

2.9. Cepas bacterianas y plásmidos utilizados

Los clonajes se llevaron a cabo con los plásmidos descritos en la Tabla 2. La multiplicación de plásmidos se realizó con las estirpes de *E. coli* XL1blue, o DB3.1 para los plásmidos del sistema *Gateway*.

Tabla 2. Plásmidos.

Plásmido	Resistencia	Características	Referencia
pGEM-T Easy™	Ampicilina	Plásmido para el clonaje de productos de PCR con el gen <i>lacZ</i> para la selección de recombinantes.	Promega
pDONR™221	Kanamicina	Plásmido para clonajes del sistema <i>Gateway</i> .	Invitrogen
pGWB4	Higromicina y kanamicina	Vector binario con el sistema de clonaje <i>Gateway</i> . Lleva el gen reportador GFP para fusionarlo en el extremo C-terminal.	(Nakagawa y col., 2007)
pSPYNE-35S	Kanamicina	Vector binario con el fragmento N-terminal de GFP y el promotor 35S para los ensayos de BiFC.	(Walter y col., 2004)
pSPYCE-35S	Glufosinato	Vector binario con el fragmento C-terminal de GFP y el promotor 35S para los ensayos de BiFC.	(Walter y col., 2004)

2.10. Métodos de microbiología

2.10.1. Crecimiento

Tanto *E. coli* como *A. tumefaciens* se cultivaron en medio lisogénico (LB) con el agente selectivo adecuado para cada caso. *E. coli* se creció a 37°C y *A. tumefaciens* a 28°C.

Para su almacenamiento a largo plazo las bacterias se crecieron en medio líquido y se añadió glicerol al 10%. Se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C.

2.10.2. Preparación de células electrocompetentes

La preparación de electrocompetentes de *E. coli* y de *A. tumefaciens* se realizó siguiendo los protocolos del electroporador *Micropulser* (Bio-Rad) con modificaciones. Brevemente, se inoculó medio LB y se creció con agitación a la temperatura adecuada durante la noche. Una vez alcanzó la densidad óptica adecuada, aproximadamente 0,7 a 600 nm, se enfrió en hielo durante 20 minutos. Se hicieron tres lavados con glicerol al 10%, centrifugando a 4000 g durante 15 minutos a 4°C, disminuyendo el volumen a la mitad en cada lavado.

Tanto las botellas de centrifugación, como el glicerol al 10% se enfriaron previamente. Tras el último lavado las células se resuspendieron en 1-2 ml de glicerol, se hicieron alícuotas y se congelaron en nitrógeno líquido. Se conservaron congeladas a -80°C hasta su utilización.

2.10.3. Transformación

La transformación de las bacterias se llevó a cabo por electroporación con un electroporador *Micropulser* (Bio-Rad). Se descongelaron en hielo 50 µl de células competentes y se mezclaron con 1 µl de DNA plasmídico, con el que se incubaron en hielo durante 5 minutos. Se utilizaron cubetas de electroporación de 0,2 cm de paso óptico, enfriadas previamente. Las descargas aplicadas en el electroporador fueron de 2,5 V para *E. coli* y 2,2 V para *A. tumefaciens*, durante 5 milisegundos. Inmediatamente después, se añadió 1 ml de medio LB y las bacterias se traspasaron a un tubo en el que se incubaron con agitación, 1 hora a 37°C en el caso de *E. coli* y 2 horas a 30°C en el caso de *A. tumefaciens*. Tras la recuperación, se sembraron en placas de LB con los antibióticos adecuados para la selección, y se incubaron hasta la aparición de colonias (24 horas para *E. coli* y 72 horas para *A. tumefaciens*).

2.11. Oligonucleótidos

En la Tabla I (Anexo I) se presentan los oligonucleótidos utilizados para la comprobación de las inserciones de T-DNA en los mutantes, la obtención de cDNAs y sondas, los clonajes, la detección de intrones retenidos y la determinación de expresión mediante qRT-PCR.

2.12. Medios de cultivo

2.12.1. Medios de cultivo *in vitro* para Arabidopsis

El cultivo *in vitro* de Arabidopsis se realizó en medio Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) a partir del preparado MS con vitaminas (*Duchefa*) según la siguiente receta: 4,7 g/l de MS (*Duchefa*), MES (*Duchefa*) 0,5 g/l y sacarosa al 1%. El pH se ajustó a 5,7 con KOH y se añadió Plantagar (*Duchefa*) 7 g/l. Se autoclavó 20 minutos a 121°C. En los casos en los que se utilizó para seleccionar plantas transgénicas, se añadieron los antibióticos adecuados, tras autoclavar.

2.12.2. Medios de cultivo para bacterias

Para el cultivo de bacterias se utilizó medio LB (*Duchefa*) 50 g/l, con agar bacteriológico 14 g/l en los casos en los que se necesitó sólido. Se autoclavó a 121°C durante 20 minutos. Los antibióticos se añadieron después de autoclavar.

2.13. Reactivos y soluciones

Acetato sódico 3 M, pH5,2. Se preparó a partir de acetato sódico trihidratado, añadiendo 408 g por litro de agua. Tras su disolución, se ajustó el pH a 5,2 con ácido acético glacial. Después de autoclavar, se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Ácido etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA) 0,5 M. Se añadieron 186g de EDTA dihidratado por litro de agua. Se ajustó el pH a 8 con NaOH. Después autoclavar, se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC) 0,1%. Se añadió 1 ml de DEPC por litro de agua y se dejó agitando toda la noche en la campana de extracción de gases. Después de autoclavar, se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Ampicilina. Se preparó una solución de almacenaje de concentración 50 mg/ml en agua. Se almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml.

Cloruro potásico (KCl) 1 M. Se disolvieron 74,56g de KCl por litro de agua. Después de autoclavar, se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Cordicepina (3'-deoxyadenosina). Se preparó una solución stock de concentración 60 mM en agua. Se almacenó a -20°C hasta su utilización a una concentración final de 150 µM.

Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%. Se disolvieron 100 g de SDS por litro de agua. Se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Hidróxido sódico (NaOH) 10 N. Se disolvieron 400 g de NaOH por litro de agua. Se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Hidróxido potásico (KOH) 10 N. Se disolvieron 561 g de KOH por litro de agua. Se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Higromicina. Se preparó una solución de almacenaje de concentración 50 mg/ml en agua. Se almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml.

Kanamicina. Se preparó una solución de almacenaje de concentración 50 mg/ml en agua. Se almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 50 µg/ml.

MOPS 10X. Se disolvieron 42 g de MOPS y 6,8 g de acetato sódico por litro, y se añadieron 20 ml de EDTA 0,5 M. Tras su disolución se ajustó el pH a 7 con NaOH 10 N. Después de autoclavar, se almacenó a temperatura ambiente, protegido de la luz, hasta su utilización.

Rifampicina. Se preparó una solución de almacenaje de concentración 25 mg/ml en dimetil sulfóxido (DMSO). Se almacenó a -20°C. Se utilizó a una concentración final de 50

µg/ml.

Solución de esterilizar semillas. Se preparó con 30% lejía y 0,01% Triton X-100 en agua. Se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Tampón de carga para geles de agarosa 6X. Azul de bromofenol 0,25%, xylene cyanol 0,25% y glicerol 30% en agua. Se almacenó a 4°C.

Tampón de carga desnaturalizante para RNA. 10 µl formamida, 3 µl formaldehído, 2 µl de MOPS 10X y bromuro de etidio. Se prepara en el momento.

Tampón de Church. 0,5 M tampón fosfato pH 7,2, 1 mM EDTA pH 8, 7% SDS y 1% BSA. Se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Tampón de incubación para tratamientos con cordicepina. 1 mM PIPES pH 6,25, 1 mM citrato sódico, 1 mM KCl y 15 mM sacarosa. Se preparó en el momento.

Tampón fosfato sódico salino con EDTA (SSPE) 20X. NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 0,2 M y EDTA 0,02 M, se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 10 N. Después de autoclavar, se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Tampón salino de citrato de sodio (SSC) 20X. NaCl 3 M, 0,3 M citrato sódico. Se prepara con 174 g NaCl y citrato sódico y se ajusta el pH a 7 con HCl. Después de autoclavar, se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

Tampón Tris-Acetato-EDTA (TAE) 50X. 242 g de Tris, 57,1 ml de ácido acético glacial y 100 ml EDTA 0,5M pH8, por litro. Después de autoclavar, se almacenó a temperatura ambiente hasta su utilización.

2.14. Análisis estadísticos

En todos los casos se calculó la media y la desviación estándar (SD) correspondiente. Los datos cuantitativos de los fenotipos de desarrollo se analizaron mediante t de *Student*, comparando cada mutante con el WT. Se utilizó un test hipergeométrico para calcular la probabilidad de solapamiento por azar entre dos grupos de genes mediante la aplicación http://nemates.org/MA/progs/overlap_stats.html. El análisis de los estudios transcriptómicos se describe con detalle en la sección correspondiente.

2.15. Programas informáticos

El análisis de las imágenes se realizó con el programa *ImageJ* del NCBI (<http://rsb.info.nih.gov/ij/index.html>). La estadística se calculó con *Excel*. La visualización de los datos de los estudios transcriptómicos se realizó con *Integrated Genome Browser* (Nicol y col.,

2009), y los diagramas de Venn se realizaron con VENNY (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>). Las secuencias de aminoácidos para los análisis filogenéticos se buscaron mediante el algoritmo *Blastp* en las bases de datos del NCBI (Altschul y col., 1990) o *Phytozome* (Goodstein y col., 2012), se alinearon utilizando *MAFFT* 6 (Kato y Toh, 2008) y los árboles filogenéticos se construyeron con *MEGA5* (Tamura y col., 2011). Las secuencias alineadas se editaron con *BioEdit* (Hall, 1999).

3. RESULTADOS

3.1. Identificación y caracterización molecular de *RCI6*, un gen de *Arabidopsis* cuyos transcritos se acumulan en respuesta a temperaturas bajas

Como se ha comentado en la Introducción, en nuestro laboratorio se aisló el gen *RCI6*, correspondiente al locus At1g03330, que codificaba una proteína con similitud a las proteínas de la familia LSM de levaduras y humanos. El hecho de que los niveles de mensajeros de *RCI6* aumentaran en respuesta a frío, y la posibilidad de que tuviera un papel en el metabolismo de RNAs motivó que procedieramos a su caracterización molecular y funcional.

3.1.1 Caracterización de la expresión de *RCI6*

En primer lugar, se comprobó que, efectivamente, la expresión de *RCI6* estaba regulada en respuesta a temperaturas bajas. Como se puede observar en la Figura 8A, en condiciones control se detectaron niveles basales de transcrito que, con la exposición a 4°C, aumentaban progresivamente hasta alcanzar un máximo a las 24-48 horas. Estos niveles se mantenían a tiempos más largos de hasta 7 días. *RCI6* se expresaba en todos los órganos de *Arabidopsis*, incluyendo hojas, raíces, tallos y flores, siendo en raíces y flores en los que se detectaban mayores niveles de transcrito (Figura. 8B). Además, en todos los órganos analizados aumentaban los niveles de transcritos de *RCI6* en respuesta a frío (Figura. 8B). Estos resultados confirman que *RCI6* es un gen de respuesta a temperaturas bajas.

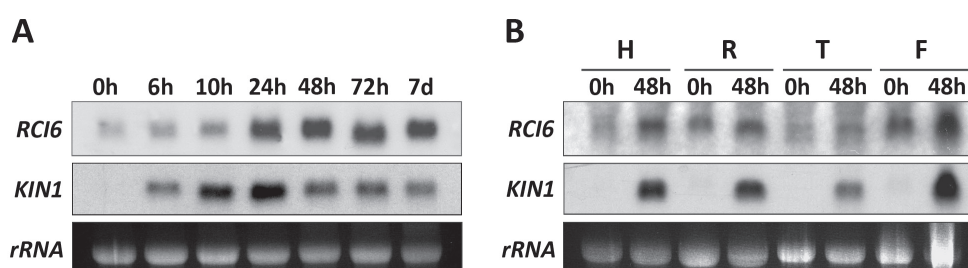


Figura 8. Acumulación de mensajeros correspondientes a *RCI6* en respuesta a temperaturas bajas.

Hibridaciones tipo *Northern* con RNA total (30 µg en cada carril). Las hibridaciones se realizaron con sondas específicas para *RCI6* y *KIN1*, que se utilizó como control de tratamiento. Como control de carga se utilizaron los *rRNAs* teñidos con bromuro de etidio. **A.** Hojas de roseta de plantas de 3 semanas expuestas a 4°C durante los tiempos indicados. **B.** Hojas de roseta (H) y raíces (R) de plantas de 3 semanas, y tallos (T) y flores (F) de plantas de 6 semanas, en condiciones control (0h) y tras 48 horas a 4°C (48h).

3.1.2. *RCI6* codifica una proteína similar a las proteínas LSM2 descritas en otros organismos

El transcrito correspondiente a *RCI6* codifica una proteína con un dominio SM formado por dos motivos, Sm1 y Sm2, con estructura secundaria en lámina β , separados por una región no conservada de longitud variable (Tharun, 2009). Los motivos Sm son característicos de una gran familia de proteínas, que se agrupan en diferentes subtipos, y que están implicadas en diferentes aspectos del metabolismo de RNAs (Beggs, 2005; Tharun, 2009). Una búsqueda en las bases de datos mostró que las secuencias aminoacídicas con mayor similitud con *RCI6* corresponden a las proteínas LSM2 de otros organismos eucariotas (Figura 9). El porcentaje de identidad entre *RCI6* y las proteínas LSM2 con las que se comparó era elevado, siendo el menor con las proteínas de *Caenorhabditis elegans* y *Saccharomyces cerevisiae* (63%), y el mayor con la de *Drosophila melanogaster* (73%). La identidad se conservaba tanto dentro de los motivos Sm como fuera de ellos (Figura 9), lo que sugería que *RCI6* era la proteína ortóloga de LSM2 en *Arabidopsis*.

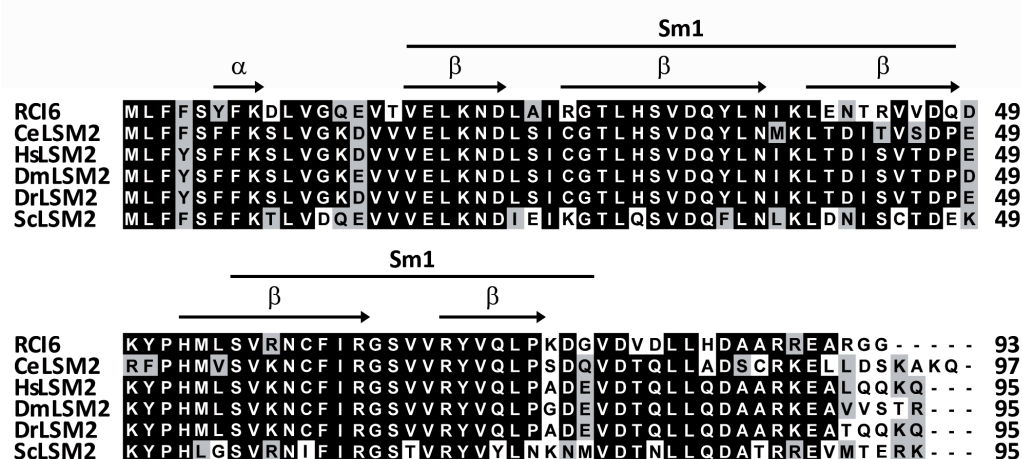


Figura 9. Alineamiento de la secuencia de *RCI6* y las proteínas LSM2 de otros organismos eucariotas.

Las secuencias de *RCI6* y de las proteínas LSM2 de *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Homo sapiens* (Hs), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Danio rerio* (Dr) y *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) se alinearon con MAFFT 6 (Katoh y Toh, 2008) y se ajustaron manualmente. El sombreado gris oscuro y el gris claro indica aminoácidos idénticos o similares, respectivamente. Sobre las secuencias se indican los residuos que forman los motivos Sm1 y Sm2, y las estructuras secundarias en hélice α o lámina plegada β .

3.1.3. LSM2 forma parte de una familia de proteínas conservadas evolutivamente que también existe en Arabidopsis

Como ya se ha expuesto en la Introducción, en levaduras y humanos hay 8 subtipos de proteínas LSMs, LSM1 a LSM8, que interaccionan entre ellas de manera precisa para formar dos complejos heteroheptaméricos de forma anular (Beggs, 2005). Uno de estos complejos, formado por las proteínas LSM1 a LSM7, es de localización citoplásmica y está implicado en la degradación de mRNAs. El otro complejo está formado por las proteínas LSM2 a LSM8, se localiza en el núcleo, y está implicado en el *splicing* (Beggs, 2005). Así pues, las proteínas LSM1 y LSM8 son específicas de los complejos citoplásmico y nuclear,

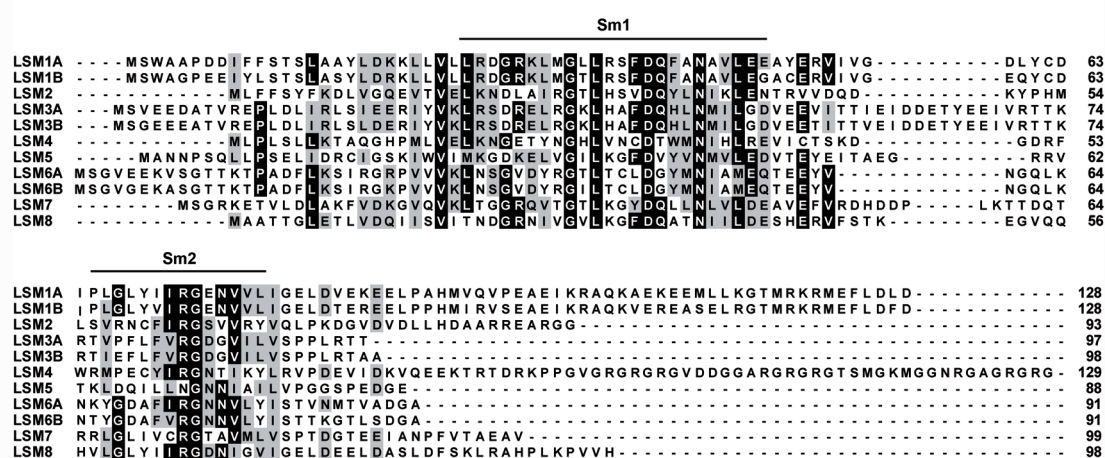


Figura 10. Alineamiento de las proteínas LSMs de Arabidopsis.

Las secuencias de las proteínas LSMs de Arabidopsis se alinearon con MAFFT 6 (Katoh y Toh, 2008) y se ajustaron manualmente. El sombreado gris oscuro y el gris claro indica aminoácidos idénticos o similares, respectivamente. Sobre las secuencias se indican las regiones que forman los motivos Sm1 y Sm2.

Tabla 3. Porcentajes de identidad (I) y similitud (S) entre las proteínas LSMs de Arabidopsis.

I/S	LSM1A	LSM1B	LSM2	LSM3A	LSM3B	LSM4	LSM5	LSM6A	LSM6B	LSM7	LSM8
LSM1A	100										
LSM1B	79/90	100									
LSM2	14/26	14/27	100								
LSM3A	12/24	12/23	17/30	100							
LSM3B	13/24	13/23	15/30	89/94	100						
LSM4	12/25	12/25	19/33	10/20	10/20	100					
LSM5	13/30	13/29	13/31	23/43	22/42	12/22	100				
LSM6A	13/25	15/23	20/33	20/37	21/38	14/26	15/34	100			
LSM6B	14/25	14/21	19/34	22/39	22/40	14/25	15/34	87/92	100		
LSM7	20/31	21/32	17/28	20/39	20/39	11/19	15/37	19/29	21/28	100	
LSM8	24/41	24/40	19/34	12/27	13/27	15/24	16/35	16/32	16/31	24/37	100

respectivamente, y les definen funcionalmente, mientras que el resto de las proteínas LSMs, de la LSM2 a la LSM7, forman parte de ambos complejos.

En plantas, la existencia de las proteínas LSM1 a LSM8 se puso de manifiesto con la secuenciación del genoma de *Arabidopsis* (Wang y Brendel, 2004). En el genoma de *Arabidopsis*, se identificaron 11 genes que codificaban las 8 proteínas LSMs que forman los complejos citoplásmico y nuclear, ya que los genes *LSM1*, *LSM3* y *LSM6* están duplicados (Wang y Brendel, 2004). El alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas LSMs de *Arabidopsis* puso de manifiesto que la similaridad era mayor en las regiones de los motivos Sm, ya que son los que dan lugar a la estructura secundaria característica de estas proteínas (Figura 10). En el resto de la secuencia, el porcentaje de identidad y similaridad entre las LSMs era bajo, excepto en el caso de las proteínas homólogas,

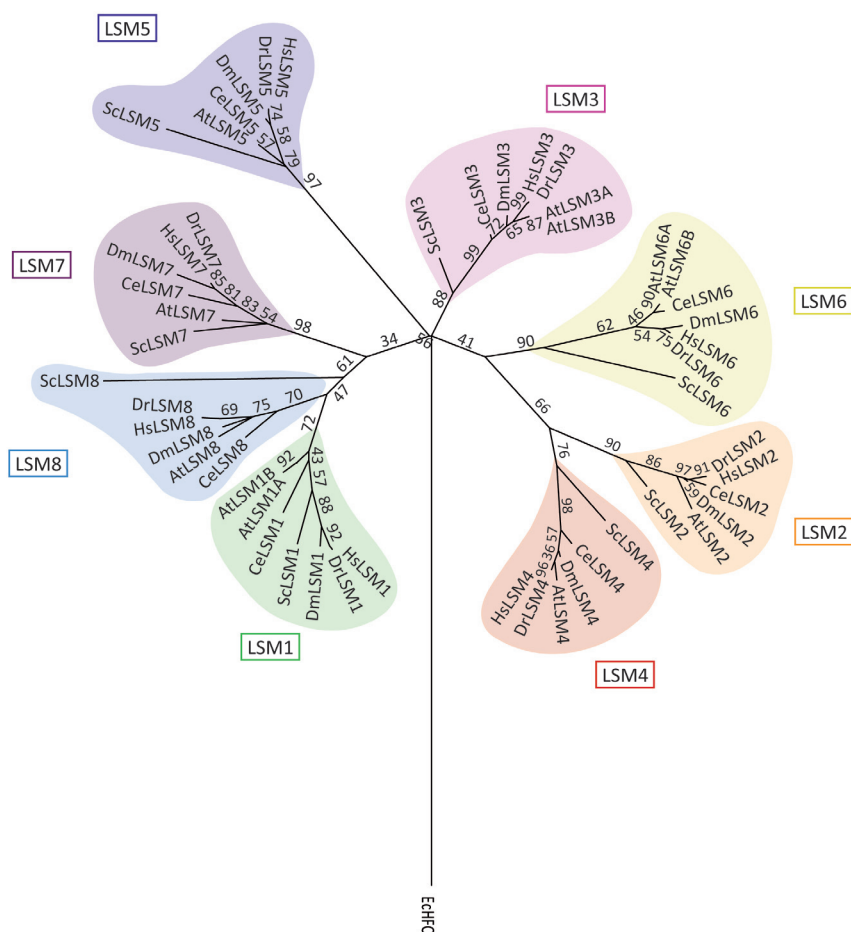


Figura 11. Análisis filogenético de las proteínas LSMs de diferentes organismos modelo.

El análisis se realizó con las secuencias aminoacídicas de las proteínas LSMs de *Arabidopsis thaliana* (At), *Caenorhabditis elegans* (Ce), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc), *Drosophila melanogaster* (Dm), *Danio rerio* (Dr), *Homo sapiens* (Hs) y *Escherichia coli* (Ec). Para la construcción del árbol se alinearon las secuencias con MAFFT 6 (Katoh y Toh, 2008) y se ajustaron manualmente. Se muestra el árbol consenso, basado en 1000 réplicas de *bootstrap*, realizado por el método *Maximum Likelihood* con MEGA5 (Tamura y col., 2011). Los valores de *bootstrap* se representan en porcentajes en cada una de las ramas, y aquellas con valores menores del 50% aparecen colapsadas.

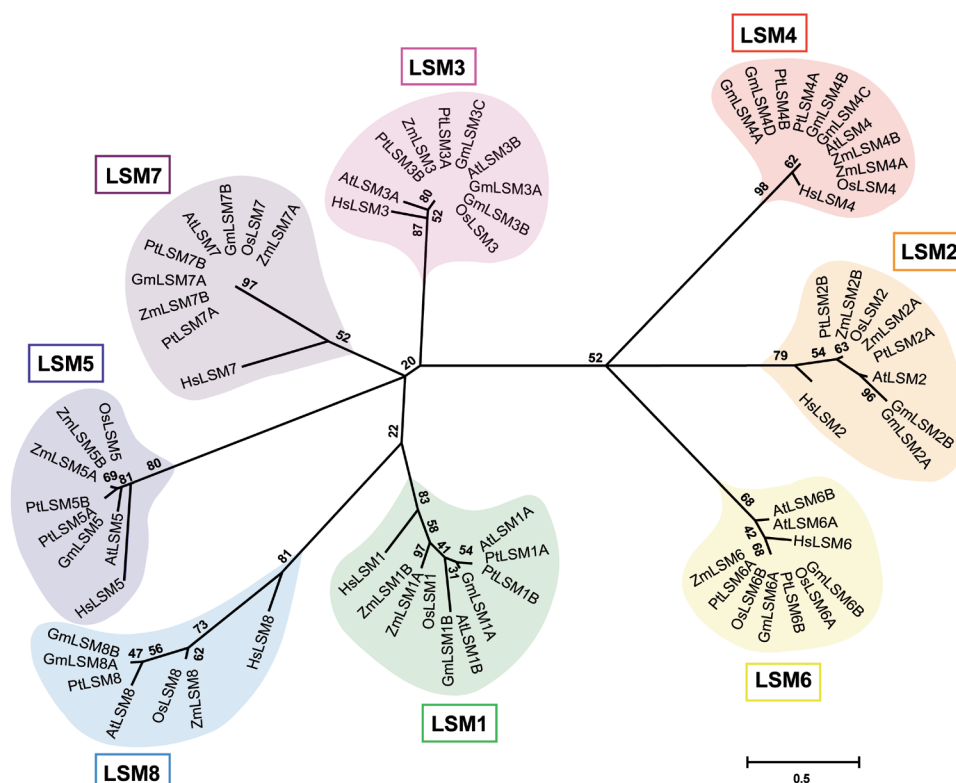


Figura 12. Análisis filogenético de las proteínas LSMs de diferentes especies vegetales.

El análisis se realizó con las secuencias aminoacídicas de las proteínas LSMs de *Arabidopsis thaliana* (At), *Glycine max* (Gm), *Populus thricocarpa* (Pt), *Oryza sativa* (Os), *Zea mays* (Zm) y *Homo sapiens* (Hs), estas últimas se utilizaron como secuencias de fuera del grupo. Las secuencias de las LSMs de las distintas especies vegetales se obtuvieron mediante BLAST en la base de datos Phytozome utilizando las secuencias de *Arabidopsis*. Los sufijos A, B, C y D indican las diferentes isoformas existentes para una LSM determinada. Las secuencias se alinearon con MAFFT 6 (Katoh y Toh, 2008) y se ajustaron manualmente. Se muestra el árbol consenso basado en 1000 réplicas de *bootstrap*, realizado por el método *Maximum Likelihood* con MEGA5 (Tamura y col., 2011). Los valores de *bootstrap* se representan en porcentajes en cada una de las ramas, y aquellas con valores menores del 50% aparecen colapsadas.

LSM1A y LSM1B, LSM3A y LSM3B, y LSM6A y LSM6B (Tabla 3). La construcción de un árbol filogenético con las LSMs de *Arabidopsis* junto con las LSMs de otros organismos eucariotas reveló que cada LSM de *Arabidopsis* aparecía agrupada en una rama junto con las LSMs del subtipo correspondiente (Figura 11). El estudio se extendió a las LSMs de otras especies de angiospermas cuyo genoma está secuenciado y, como se ve en el árbol de la Figura 12, en todas las especies analizadas se encontraron los 8 subtipos de LSMs con una o varias LSMs duplicadas. Por tanto, las proteínas LSMs de *Arabidopsis*, y en general las LSMs de angiospermas, encajan en el modelo evolutivo ya descrito, en el que a partir de un único antecesor, con un motivo Sm, y mediante eventos de duplicación y divergencia, aparecieron las diferentes proteínas LSMs antes de la radiación de los eucariotas (Veretnik y col., 2009).

3.1.4. Los genes *LSMs* de *Arabidopsis* se expresan de forma ubicua y sus transcritos se acumulan en respuesta a temperaturas bajas

El análisis de la expresión de los 11 genes *LSMs* de *Arabidopsis* mediante hibridaciones tipo *Northern* reveló que todos ellos se expresan en hojas, raíces, flores y tallos (Figura 13A).

Ya que los niveles de RNA mensajero de *RCI6/LSM2* estaban regulados positivamente por temperaturas bajas, nos planteamos la posibilidad de que también lo estuvieran los transcritos que codifican el resto de proteínas *LSMs* de *Arabidopsis*. Al igual que ocurría con *RCI6/LSM2*, para todos los otros genes también se detectó un aumento de los mensajeros correspondientes en respuesta a este estrés abiótico (Figura 13B). En el caso de *LSM1b*, *LSM4*, *LSM6b* y *LSM7*, el aumento era menor que en el del resto de transcritos,

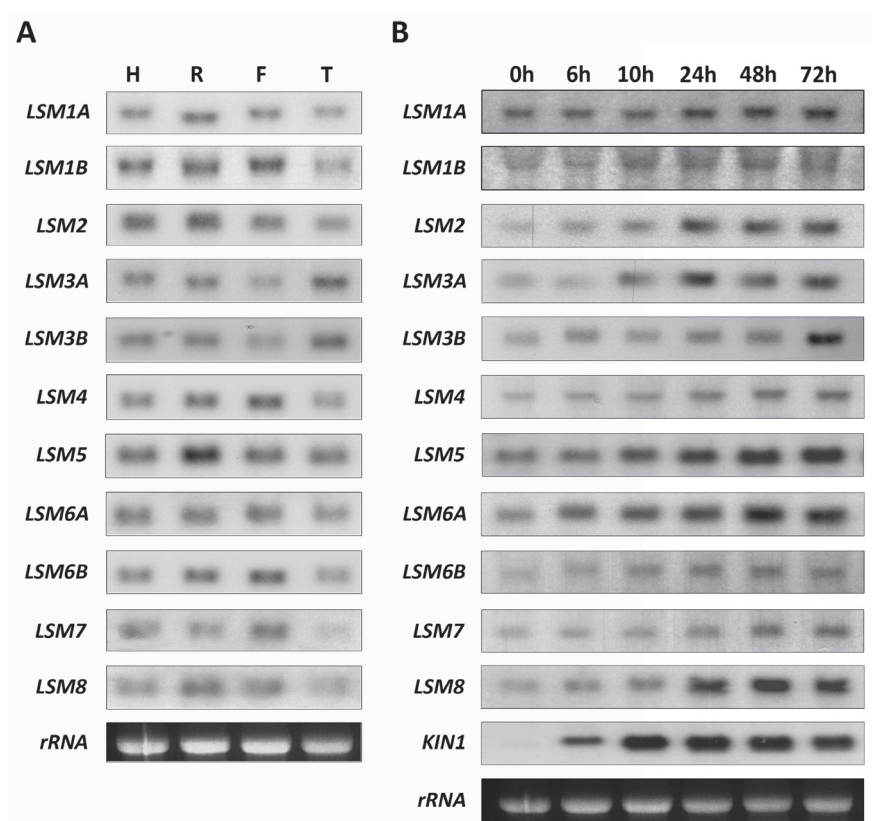


Figura 13. Análisis de la expresión de los genes *LSMs* de *Arabidopsis* en diferentes órganos y en respuesta a frío.

Hibridaciones tipo *Northern* con RNA total (30 µg en cada carril). Las hibridaciones se realizaron con sondas específicas para cada *LSM*. Como control de carga se utilizaron los *rRNAs* teñidos con bromuro de etidio. **A.** Hojas de rosetas (H) y raíces (R) de plantas de 3 semanas, y flores (F) y tallos (T) de plantas de 6 semanas. **B.** Rosetas de plantas de 3 semanas expuestas a 4°C durante los tiempos indicados. Como control de tratamiento se utilizó una sonda específica para *KIN1*.

aunque en todos el nivel máximo se alcanzaba a las 24-48 horas y se mantenía elevado hasta las 72 horas.

3.2. Caracterización funcional del complejo nuclear LSM2-LSM8 de *Arabidopsis*

Teniendo en cuenta que las proteínas LSMs de plantas, y obviamente las de *Arabidopsis*, no habían sido caracterizadas funcionalmente, decidimos determinar si existía un complejo nuclear LSM2-LSM8 en *Arabidopsis* y, de ser así, si era funcionalmente equivalente al de levaduras y humanos. Con este objetivo, en primer lugar estudiamos la localización subcelular de LSM8, así como su interacción con otras LSMs del complejo. Además, identificamos mutantes de pérdida de función de LSM8, con los que analizamos si el complejo LSM2-LSM8 era funcionalmente equivalente al de levaduras y humanos.

3.2.1. La proteína LSM8 de *Arabidopsis* se localiza en el núcleo

Para determinar la localización subcelular de LSM8, se fusionó un fragmento de DNA genómico, formado por 1161 pares de bases de la región promotora y la secuencia genómica de *LSM8*, al cDNA de GFP. Con esta construcción, *LSM8_{pro}-LSM8-GFP*, se transformaron plantas de *Arabidopsis* en las que se detectó GFP mediante microscopía confocal. La proteína de fusión, LSM8-GFP, se localizó en el núcleo con un patrón disperso, menos intenso en el nucleolo (Figura 14). Esta localización es similar a la descrita para las LSM8 de levaduras y humanos, y es compatible con la participación de la LSM8 de *Arabidopsis* en un complejo nuclear de LSMs, y con un papel en el *splicing* de pre-mRNAs.

Como se ha comentado anteriormente, en levaduras y humanos la proteína LSM8 es específica del complejo nuclear LSM2-LSM8, mientras que las proteínas LSM2-LSM7 también forman parte del complejo citoplásmico. Así pues, una vez establecida la localización nuclear de LSM8 en *Arabidopsis*, se procedió a determinar la localización de la proteína LSM4 de *Arabidopsis* como control de la especificidad de la localización nuclear de LSM8. El análisis de la localización subcelular de LSM4, llevado a cabo en plantas de *Arabidopsis* transformadas con una construcción análoga a la de LSM8, *LSM4_{pro}-LSM4-GFP*, mostró que LSM4-GFP se localizaba tanto en el núcleo como en el citoplasma, con un patrón disperso, sugiriendo que, como en otros organismos, la proteína LSM4 de

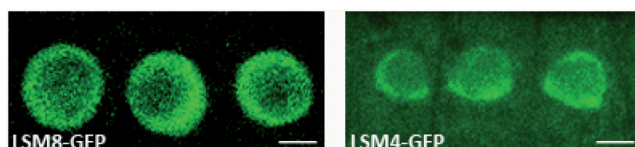


Figura 14. Localización subcelular de la proteína LSM8 de *Arabidopsis*.

Localización subcelular de LSM8-GFP y LSM4-GFP en células de raíz de plántulas de *Arabidopsis* de 6 días. Las barras representan 10 μ m.

Arabidopsis estaría formando parte tanto del complejo nuclear, junto con LSM8, como del complejo citoplásmico (Figura 14).

3.2.2. La proteína LSM8 de Arabidopsis interacciona *in vivo* con LSM2 y LSM4

Se ha descrito que las proteínas LSMs forman complejos heteroheptaméricos de forma anular, y en levaduras se ha determinado el orden preciso en el que se sitúan las diferentes proteínas LSMs para formar los complejos nuclear y citoplásmico (Figura 15A) (Achsel y col., 1999; Zhou y col., 2014). Una vez establecido que la proteína LSM8 de Arabidopsis tenía la misma localización subcelular que en otros organismos, procedimos a analizar si interaccionaba con las proteínas que la flanquean en levaduras y humanos, LSM2 y LSM4, mediante experimentos de BiFC (Walter y col., 2004). Se realizaron fusiones transcripcionales entre los cDNAs correspondientes a LSM8 y el que codifica el segmento N-terminal de la proteína GFP (*LSM8-nGFP*), y los correspondientes a las proteínas LSM2 y LSM4 y el que codifica el segmento C-terminal (*LSM2-cGFP* y *LSM4-cGFP*). Con estas construcciones se cotransformaron hojas de *N. benthamiana* y se analizaron mediante microscopía confocal para detectar actividad GFP. Se observó fluorescencia, tanto en las células de las plántulas cotransformadas con *LSM8-nGFP* y *LSM2-cGFP*, como en las de las plántulas cotransformadas con *LSM8-nGFP* y *LSM4-cGFP*, lo que indicaba que LSM8

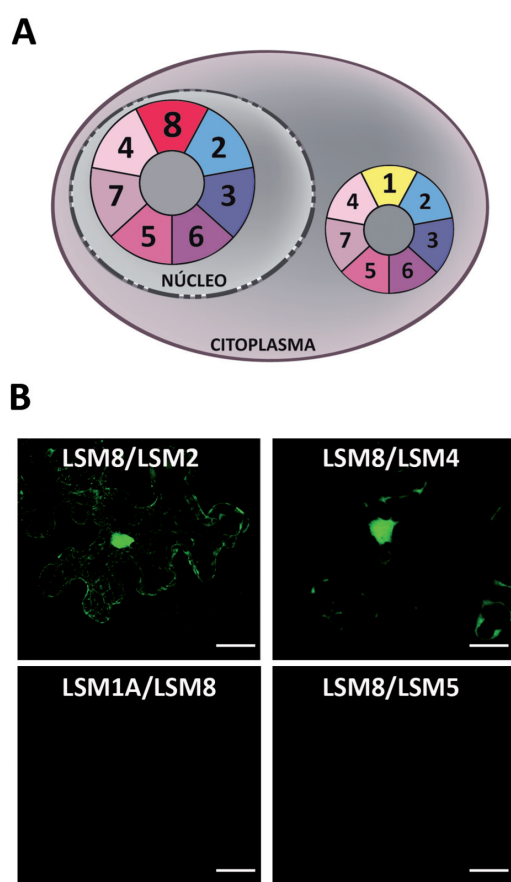


Figura 15. Interacciones de la proteína LSM8 de Arabidopsis en el complejo nuclear.

A. Modelo celular en el que se muestran los complejos de LSMs, tal y como se han descrito para levaduras y humanos. **B.** Ensayos de BiFC en hojas de *Nicotiana benthamiana* cotransformadas con construcciones *LSM-nGFP/LSM-cGFP* para visualizar las interacciones de LSM8 con otras LSMs de Arabidopsis mediante microscopía confocal. Se muestran los resultados para las interacciones LSM8/LSM2, LSM8/LSM4, LSM1/LSM8 y LSM8/LSM5. Las barras representan 20 μm.

interaccionaba con ambas proteínas (Figura 15B). La especificidad de estas interacciones se determinó analizando la interacción entre LSM8 y LSM1A (*LSM1A-cGFP*), que forma parte del complejo citoplásmico (LSM1-LSM7), y LSM5 (*LSM5-cGFP*), que se sitúa en una posición opuesta a LSM8 en el complejo nuclear (Khusial y col., 2005; Zhou y col., 2014) (Figura 15A). En ninguno de los dos casos se observó fluorescencia en las células de las plantas cotransformadas, indicando que LSM8 no interaccionaba directamente ni con LSM1A ni con LSM5, y que su interacción con LSM2 y LSM4 era específica (Figura 15B). Estos resultados sugieren fuertemente que, como se ha determinado para el complejo nuclear de levaduras, en *Arabidopsis*, LSM8 también estaría flanqueada por LSM2 y LSM4. Además, la interacción de LSM8 con LSM2 y LSM4 se detectaba principalmente en el núcleo apoyando la hipótesis de la formación de un complejo de localización nuclear similar a los ya descritos en otros organismos (Beggs, 2005; Khusial y col., 2005).

3.2.3. La proteína LSM8 de *Arabidopsis* es esencial para la formación del complejo nuclear de LSMs

La localización nuclear de la proteína LSM8 de *Arabidopsis* y el hecho de que interaccionara *in vivo* con LSM2 y LSM4 sugería que podía ser ortóloga de las proteínas LSM8 de levaduras y humanos. Para determinar si, como en estos organismos, se requiere para la formación del complejo nuclear de LSMs en *Arabidopsis*, buscamos mutantes de pérdida de función para *LSM8* en las colecciones disponibles de líneas de inserción de T-DNA. Se identificaron dos líneas de inserción de T-DNA, Salk-025064 y Salk-048010, ambas en fondo Col-0, con las inserciones localizadas en el último exón del gen *LSM8*, a 25 y 11 pares de bases del codon de terminación, respectivamente (Figura 16A). El análisis de expresión en plantas homocigotas para estas inserciones de T-DNA confirmó que en ninguna de ellas

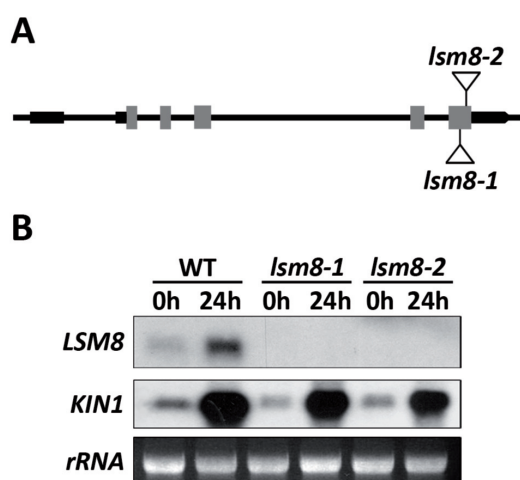
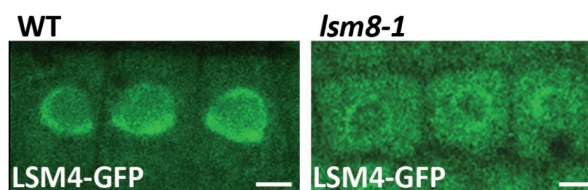


Figura 16. Identificación de los mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2*.

A. Localización de las inserciones de T-DNA en el gen *LSM8* en los mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2*. Los rectángulos grises indican exones y las líneas más gruesas indican regiones no traducidas en 5' y 3'. Las inserciones de T-DNA se indican mediante triángulos. **B.** Hibridaciones tipo *Northern* con RNA total (30 µg en cada carril) extraído de rosetas de plantas de 3 semanas de genotipo WT, *lsm8-1* y *lsm8-2*, en condiciones control (0h) o expuestas a 4°C durante 24 horas (24h). Las hibridaciones se realizaron con la sonda específica de *LSM8*. Como control de tratamiento se utilizó una sonda específica para *KIN1*. Como control de carga se utilizaron los rRNAs teñidos con bromuro de etidio.

Figura 17. Localización subcelular de LSM4-GFP en ausencia de LSM8.

Localización subcelular de LSM4-GFP en células de raíz de plántulas WT y mutantes *lsm8-1* de 6 días. Las barras representan 10 μ m.



se acumulaban transcritos de *LSM8*, ni en condiciones control ni tras la exposición a 4°C, lo que indicaba que se trataba de mutantes nulos o altamente hipomórficos (Figura 16B). Ambos mutantes eran viables, aunque presentaban alteraciones en el desarrollo que se describen con detalle más adelante (Sección 3.3.1), y se denominaron *lsm8-1* (Salk-025064) y *lsm8-2* (Salk-048010). Las plantas *lsm8-1* transformadas con la construcción *LSM8_{pro}-LSM8-GFP (c-lsm8)* recuperaban el fenotipo WT (Anexo II) (Perea-Resa y col., 2012), lo que confirmaba que los fenotipos mutantes se debían a la ausencia de LSM8 y que la construcción utilizada para la localización subcelular de LSM8 era funcional.

En levaduras, la localización subcelular del complejo nuclear de LSMs, y por tanto su especificidad funcional, está determinada, principalmente, por la presencia de la proteína LSM8 en el mismo, de forma que una vez formado el complejo LSM2-LSM8 este se traslada al núcleo (Spiller y col., 2007b). Para determinar si en *Arabidopsis* también se requería la presencia de LSM8 para la formación del complejo nuclear, se analizó la distribución subcelular de la proteína LSM4, componente de los complejos citoplásmico y nuclear de LSMs, en el fondo mutante *lsm8-1*. El análisis de plantas mutantes *lsm8-1* transformadas con la construcción *LSM4_{pro}-LSM4-GFP* mostró que la proteína LSM4-GFP, en lugar de localizarse en el núcleo y en el citoplasma, como ocurría en las células de plantas WT, se localizaba preferentemente en el citoplasma (Figura 17). Estos resultados demuestran que la proteína LSM8 también es necesaria para la formación del complejo nuclear de LSMs en *Arabidopsis*.

3.2.4. El complejo nuclear LSM2-LSM8 de *Arabidopsis* estabiliza el U6 snRNA

En levaduras y humanos, el complejo nuclear de LSMs forma el núcleo proteico que interacciona y estabiliza el U6 snRNA, contribuyendo a la formación del espliceosoma (Beggs, 2005). Con el fin de determinar si el complejo nuclear LSM2-LSM8 de *Arabidopsis* tiene la misma función estabilizadora del U6 snRNA, en primer lugar se analizaron los niveles de U6 snRNA en los mutantes *lsm8*. También se analizaron, a modo de control, los niveles de U6 snRNA en mutantes nulos disponibles para otras LSMs. El mutante *lsm4-1*, nulo para *LSM4* (Zhang y col., 2011), cuya mutación en levaduras afecta a los niveles de U6 snRNA (Mayes y col., 1999), se utilizó como control positivo. El doble mutante *lsm1a lsm1b*, que carece de proteínas LSM1, se utilizó como control negativo (Perea-Resa y col., 2012). Además, como controles de especificidad de la función de LSM8, también se analizaron

los niveles de U4 snRNA, que no interacciona con las proteínas LSMs (Mayes y col., 1999), y de U3 snoRNA, que al igual que el U6 snRNA es transcrito por la RNA polimerasa III (Waibel y Filipowicz, 1990). Como se muestra en la Figura 18, los niveles de U6 snRNA eran más bajos en ambos mutantes *lsm8* que en el WT. Igualmente, se observaron menores niveles de U6 snRNA en el mutante *lsm4-1*, mientras que en el mutante *lsm1a lsm1b* no se observaron diferencias significativas con respecto a las plantas WT. Estos resultados indicaban que únicamente las proteínas que forman el complejo nuclear tenían un efecto sobre los niveles de U6 snRNA. Por otro lado, en ninguno de los mutantes analizados se observaron disminuciones en los niveles de U4 snRNA o U3 snoRNA respecto al WT, lo que indicaba que el complejo nuclear de LSMs de Arabidopsis afecta específicamente a los niveles de U6 snRNA.

Una vez establecido que los niveles de U6 snRNA eran menores en ausencia del complejo nuclear de LSMs, se procedió a determinar si dicha disminución era debida a su desestabilización como ocurre en levaduras (Mayes y col., 1999). Para ello, estudiamos la vida media del U6 snRNA en los mutantes *lsm8*, *lsm1a lsm1b* y *lsm4-1*, paralizando la transcripción mediante la adición de cordicepina y analizando el nivel de los transcritos a lo largo del tiempo (Gutiérrez y col., 2002). Los resultados mostraron que en los mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2* los niveles de U6 snRNA disminuían rápidamente, de forma que a las 29 horas de añadir la cordicepina no había transcritos perceptibles, mientras en el WT los niveles de U6 snRNA se mantenían casi invariables hasta las 34 horas del tratamiento (Figura 19). En el mutante *lsm4-1*, los niveles de U6 snRNA también disminuían rápidamente, siendo indetectables a las 9 horas (Figura 19). En el doble mutante *lsm1a lsm1b*, sin embargo, la desaparición del U6 snRNA en el tiempo era análoga a la del WT (Figura 19). En todos los casos, los niveles de U4 snRNA y U3 snoRNA permanecían estables en todos los genotipos analizados (Figura 19). En su conjunto, estos resultados revelaban que el complejo nuclear LSM2-LSM8 de Arabidopsis es necesario para la estabilización del U6 snRNA.

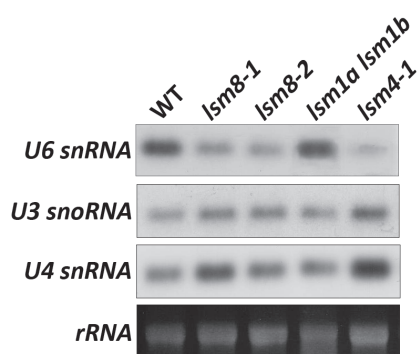


Figura 18. Niveles de U6 snRNA en ausencia del complejo nuclear LSM2-LSM8 de Arabidopsis.

Hibridaciones tipo *Northern* con RNA total (5 µg en cada carril) extraído de rosetas de plantas WT, *lsm8-1*, *lsm8-2*, *lsm1a lsm1b* y *lsm4-1*, de 2 semanas. Las hibridaciones se realizaron con sondas específicas. Como control de carga se utilizaron los rRNAs teñidos con bromuro de etidio.

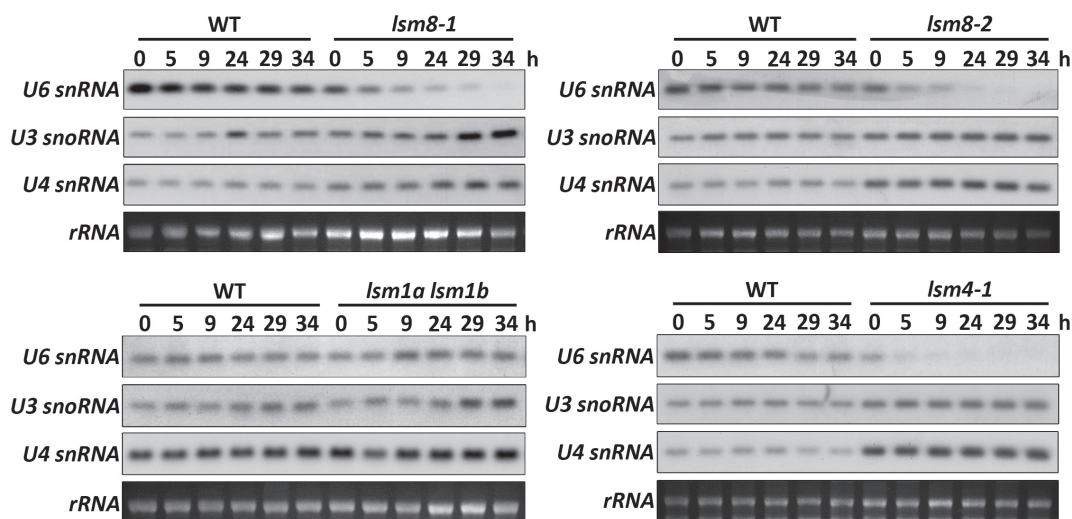


Figura 19. Estabilidad del U6 snRNA en ausencia del complejo nuclear LSM2-LSM8 de Arabidopsis.

Hibridaciones tipo *Northern* con RNA total (5 µg en cada carril) extraído de plántulas WT, *lsm8-1*, *lsm8-2*, *lsm1a lsm1b* y *lsm4-1*, de 6 días tratadas con cordicepina durante los tiempos indicados. Las hibridaciones se realizaron con sondas específicas. Como control de carga se utilizaron los rRNAs teñidos con bromuro de etidio.

3.2.5. El complejo nuclear LSM2-LSM8 de Arabidopsis participa en el *splicing* de pre-mRNAs

Dado que en Arabidopsis el complejo LSM2-LSM8 estabiliza el U6 snRNA, analizamos si también estaba implicado en el *splicing* de los pre-mRNAs. Para comprobar esta hipótesis, se utilizaron micromatrices de genoma completo (*Affymetrix Arabidopsis Tiling 1.0R*) en las cuales está representada toda la secuencia del genoma de Arabidopsis mediante sondas no solapantes de 25 nucleótidos. La hibridación de estas micromatrices con RNA total permite detectar la actividad transcripcional a lo largo de todo el genoma, incluidos los intrones. Las micromatrices se hibridaron con RNA total de plantas *lsm8-1* y WT, y se compararon las señales de hibridación de las sondas correspondientes a los intrones entre el mutante *lsm8-1* y el WT. Se encontraron 469 intrones, correspondientes a 453 genes, con una señal de hibridación mayor en el mutante, lo que indicaba que estos intrones podrían estar retenidos (Tabla II, Anexo I). Los resultados obtenidos del análisis de las señales de hibridación de las micromatrices (Figura 20A) se validaron, mediante RT-PCR, para un grupo de genes implicados en diferentes procesos fisiológicos y moleculares, incluyendo transducción de la señal (*AT2G43850*, *CKL5* y *AME3*), biosíntesis de esfingolípidos (*AT2G33205*), metiltransferasas (*AT1G19340*), procesos de desarrollo (*PRMT4A*), metabolismo de proteínas (*AT1G17960*) o transporte intracelular (*AT3G59390*) (Lamesch y col., 2012) (Figura 20B). Además, como control negativo, se analizó el segundo intrón

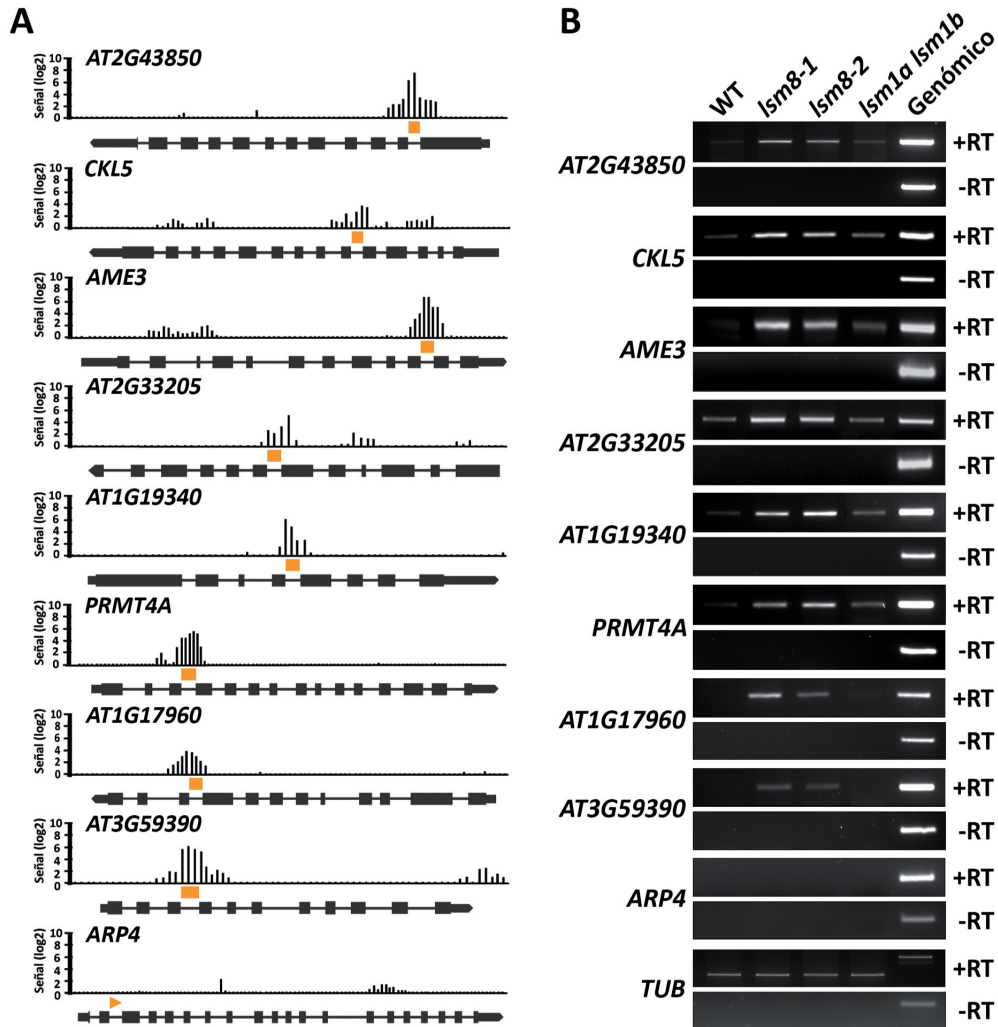


Figura 20. Retención de intrones en ausencia del complejo LSM2-LSM8 de Arabidopsis.

A. Señales de hibridación obtenidas en las micromatrices tipo *tiling* para los genes seleccionados. Las barras verticales representan la diferencia en la intensidad de la señal de hibridación entre el mutante *lsm8-1* y el WT para todas las sondas situadas a lo largo de los genes representados. La estructura de cada gen (TAIR7) está representada por cajas negras anchas, líneas, y cajas estrechas en los extremos que simbolizan exones, intrones y regiones no traducidas, respectivamente. Los rectángulos y el triángulo naranjas representan intrones retenidos y el intrón analizado como control negativo, respectivamente. Las gráficas de representación de la señal de las sondas sobre la estructura génica se obtuvieron con el programa *Integrated Genome Browser* (Nicol y col., 2009).

B. Validación de los eventos de retención de intrones detectados en el mutante *lsm8-1*. Se realizaron RT-PCRs con RNA total de plantas WT, *lsm8-1*, *lsm8-2* y *lsm1a lsm1b* de 2 semanas, y oligonucleótidos específicos para cada intrón. En todos los casos, uno de los oligonucleótidos estaba situado dentro del intrón retenido y el otro en uno de los exones adyacentes. +RT indica reacciones de retrotranscripción. Como controles se utilizaron DNA genómico (Genómico) y RNAs sin retrotranscribir (-RT). La expresión del gen *TUBULINA* se utilizó como control de carga.

del gen *ARP4*, para el que el análisis de las señales de hibridación de las micromatrices no indicaba que estuviera retenido en el mutante *lsm8-1*. También se realizó el análisis en el doble mutante *lsm1a lsm1b*, que como habíamos comprobado no está implicado en la estabilidad del U6 snRNA (Figura 19). Todos los intrones analizados resultaron estar retenidos en ambos alelos *lsm8*, pero no en las plantas WT ni en el doble mutante *lsm1a lsm1b* (Figura 20B). El intrón de *ARP4*, sin embargo, no aparecía retenido en ninguno de los genotipos analizados (Figura 20B). Los resultados demuestran, por tanto, la participación del complejo LSM2-LSM8 de Arabidopsis en el proceso de *splicing* de pre-mRNAs.

3.3. El complejo nuclear LSM2-LSM8 es esencial para el correcto desarrollo de Arabidopsis

3.3.1. Los mutantes *lsm8* presentan alteraciones en el desarrollo

Como se ha comentado en la sección anterior, los mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2* presentaban serias alteraciones del desarrollo. En ambos alelos se observaban los mismos fenotipos, aunque eran más acusados en *lsm8-1*. Los mutantes *lsm8* no mostraban diferencias en el tiempo de germinación respecto a las plantas de genotipo WT (Figura 21A), sin embargo, una vez germinadas, un porcentaje elevado de las plántulas exhibía anomalías en los cotiledones (Figura 21B). La alteración más frecuente que se observó fue la aparición de plántulas con 3 cotiledones, en unos porcentajes del 3,5% y 0,6% respecto al total para *lsm8-1* y *lsm8-2*, respectivamente (Tabla 4). Por otra parte, los mutantes *lsm8* tenían un mayor porcentaje de cotiledones con las 4 areolas de los haces vasculares completamente cerradas, 30% frente al 18% del WT (Figuras 21C y D). Más adelante en el desarrollo, las plantas *lsm8-1* y *lsm8-2* presentaban rosetas un 48% y un 28% más pequeñas, respectivamente, que las plantas WT (Figuras 22A y B). Este menor tamaño era debido, principalmente, a una menor longitud de los peciolo y a que las hojas eran ligeramente más pequeñas en los mutantes (Figuras 22C a E). Además, las hojas de la roseta eran más planas que las del genotipo WT y ligeramente más oscuras (Figura 23A). El sistema radicular de los mutantes también estaba menos desarrollado. Las raíces de los mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2* eran un 45% y un 20% más cortas, respectivamente, que las del WT y, además, producían menos raíces secundarias (Figuras 22F a H). Los mutantes florecían al mismo tiempo que el WT en día largo, pero presentaban un fenotipo de floración temprana en día corto, ya que florecían con una media de 20 (*lsm8-1*) y 10 (*lsm8-2*) hojas menos que el WT (Figuras 23A a C). En las flores de los mutantes no se apreciaban diferencias con las del WT, pero las silicuas si eran significativamente más cortas y tenían menos semillas que, además, estaban abortadas en un alto porcentaje (Figuras 23D a G). Todos estos resultados demuestran que el complejo nuclear LSM2-LSM8 es necesario para que se produzca el correcto desarrollo de Arabidopsis, desde la germinación de la semilla hasta la floración y la fructificación.

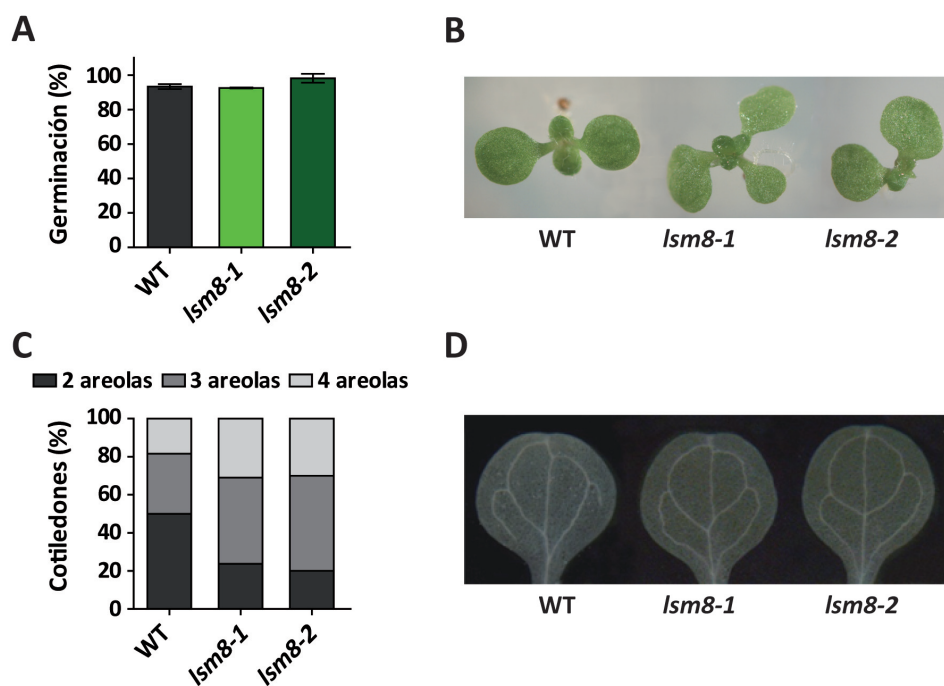


Figura 21. Germinación de los mutantes *lsm8* y fenotipos de sus cotiledones.

Cuantificaciones e imágenes representativas de plantas de genotipo WT, *lsm8-1* y *lsm8-2*. **A.** Porcentaje de germinación 5 días después de la estratificación. Se analizaron al menos 300 semillas de cada genotipo. Se representa la media con la desviación estándar. **B.** Plántulas de 5 días. **C.** Porcentaje de cotiledones con 2, 3 o 4 areolas cerradas. Los datos se obtuvieron de un mínimo de 50 plántulas por genotipo. **D.** Patrones vasculares de cotiledones de plántulas de 12 días.

Tabla 4. Número y porcentaje de plántulas mutantes *lsm8* con anomalías en los cotiledones.

	Nº plántulas totales	Nº plántulas anómalas	% plántulas anómalas	1 cotiledón	2 cotiledones*	3 cotiledones	% 3 cotiledones
WT	584	0	0	0	0	0	0
<i>lsm8-1</i>	549	23	4,2	2	2	19	3,5
<i>lsm8-2</i>	616	8	1,3	2	2	4	0,6

*Dos cotiledones pero al menos uno de ellos de forma o tamaño anómalos

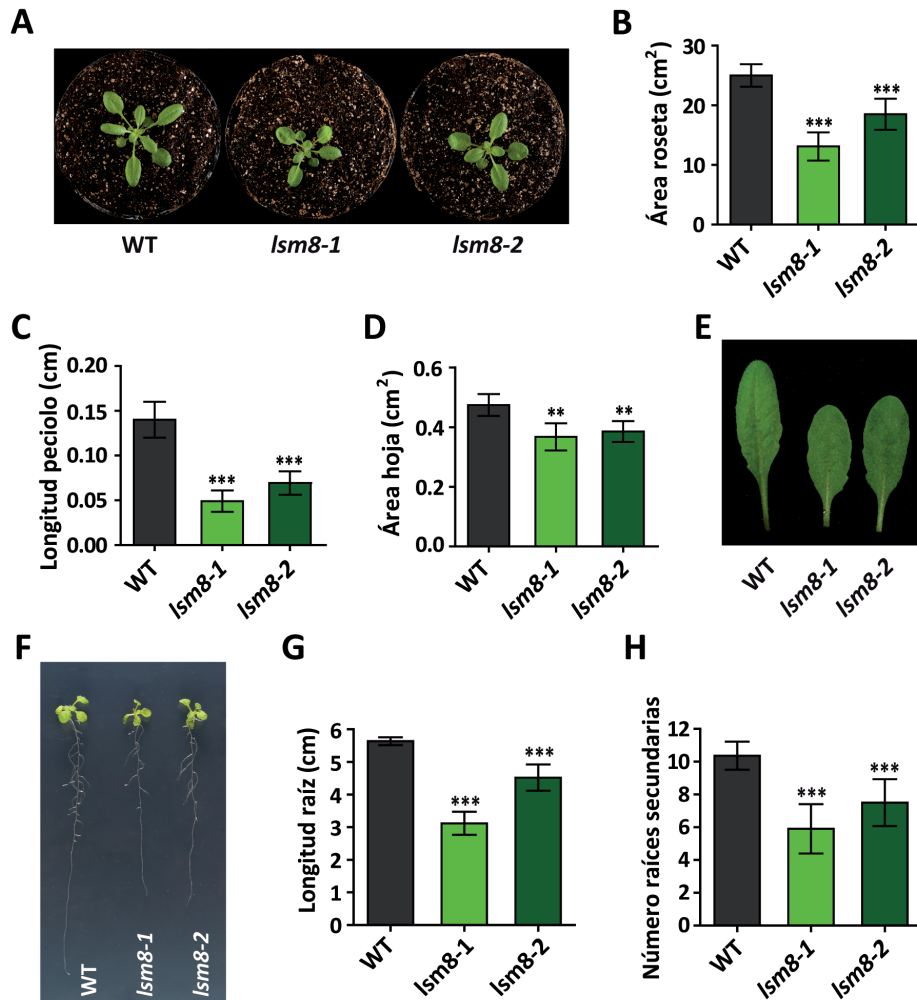


Figura 22. Fenotipos de la roseta y las raíces de los mutantes *lsm8*.

Imágenes representativas de plantas WT, *lsm8-1* y *lsm8-2* (A, E y F). A. Rosetas de plantas de 25 días. E. Hojas de roseta. F. Plántulas de 11 días crecidas en vertical. Cuantificaciones del tamaño de la roseta (B), longitud de los peciolo (C), área de las hojas (D), longitud de la raíz principal (G) y número de las raíces secundarias (H) de plantas de genotipo WT, *lsm8-1* y *lsm8-2*. B. Tamaño de la roseta de plantas de 25 días. Se midió el área circular que ocupa la roseta de 25 plantas de cada genotipo. C. Longitud de los peciolo de la primera y segunda hojas de plántulas de 10 días. Se midieron un mínimo de 25 peciolo por genotipo. D. Área de la tercera y cuarta hoja de plantas de 15 días. Se midieron las hojas de un mínimo de 20 plantas por genotipo. G. Longitud de la raíz principal de plántulas de 11 días. H. Número de raíces secundarias en plántulas de 11 días. G y H. La longitud de la raíz y el número de raíces secundarias se midieron en un mínimo de 60 plántulas por genotipo. En B, C, D, G y H, se representan las medias con sus desviaciones estándar. Los asteriscos representan el grado de significación, respecto al WT, determinado mediante un análisis t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

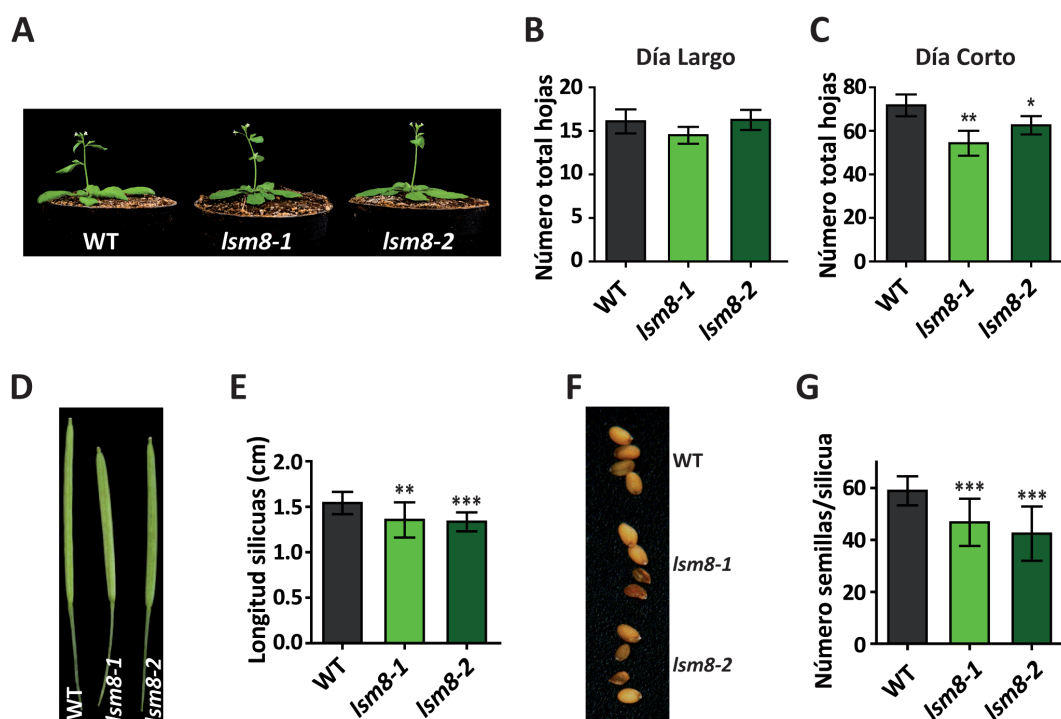


Figura 23. Fenotipos de floración, de las silicuas y las semillas de los mutantes *lsm8*.

Cuantificaciones e imágenes representativas de plantas de genotipo WT, *lsm8-1* y *lsm8-2*. **A.** Plantas de 6 semanas. **B y C.** Tiempo de floración estimado a partir del número de hojas totales en el momento de la floración en condiciones de día largo (**B**) y día corto (**C**). Se midió en un mínimo de 24 plantas por genotipo, para cada fotoperiodo. **D.** Silicuas representativas. **E.** Longitud de la sexta y séptima silicua del tallo principal. Se midieron un mínimo de 25 silicuas por genotipo. **F.** Semillas representativas. **G.** Número de semillas de la sexta y séptima silicua del tallo principal. Se contaron la semillas de un mínimo de 20 silicuas. En **B**, **C**, **F** y **G**, se representan las medias con sus desviaciones estándar. Los asteriscos representan el grado de significación, respecto al WT, determinado mediante un análisis t de Student (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

3.3.2. El complejo LSM2-LSM8 es necesario para el correcto *splicing* y expresión de genes de desarrollo

Teniendo en cuenta que el complejo nuclear LSM2-LSM8 participaba en el *splicing* de pre-mRNAs y que además provocaba defectos en el desarrollo de *Arabidopsis*, se identificaron los genes implicados en procesos del desarrollo que presentaban retención de intrones en los mutantes *lsm8*. De los 453 genes que tenían intrones retenidos en el mutante *lsm8-1* (Tabla II, Anexo I), 65 (14%) habían sido relacionados con diferentes procesos de desarrollo en base a análisis de ontogenia y fenotipos de mutantes (Tabla II, Anexo I, negrita). La retención de intrones en algunos de estos genes como *ABNORMAL SUSPENSOR1/DICER-LIKE1* (*ASU1/DCL1*), *EMBRYO DEFECTIVE 2785* (*EMB2785*) y

EMBRYO DEFECTIVE 2016 (*EMB2016*), que afectan al desarrollo embrionario (Meinke y col., 2008), *OLIGOCELLULA2* (*OLI2*), que controla el tamaño de los órganos (Fujikura y col., 2009), y *GLUCURONOXILAN GLUCURONOSILTRANSFERASE* (*GUT2*), que participa en la biogénesis de la pared celular secundaria (Brown y col., 2009), se validó mediante RT-PCR (Figura 24). Como control negativo se analizó el tercer intrón de *AINTEGUMENTA* (*ANT*), un gen también implicado en el desarrollo (Krizek, 2011) pero que no mostraba retención de intrones en *lsm8-1*. En todos los casos, el intrón retenido se detectó en ambos alelos *lsm8*, excepto para *ANT*, mientras que no se detectó en el WT (Figura 24).

Decidimos entonces estudiar si la retención de intrones en genes implicados en el desarrollo podía afectar a la expresión génica relacionada con el desarrollo. Para ello, puesto que las micromatrices de genoma completo tipo *tiling* permiten también la detección de actividad transcripcional (Laubinger y col., 2008b), analizamos los resultados obtenidos de las hibridaciones llevadas a cabo para detectar genes con mayores o menores niveles de transcritos en el mutante *lsm8-1* respecto al WT. Un total de 257 genes aparecían desregulados en el mutante *lsm8-1*, de los que 65 estaban más altos, y 193 más bajos, al menos 2 veces (Tabla III, Anexo I). El análisis ontológico y/o los fenotipos de plantas con ausencia o ganancia de función de los genes desregulados reveló que un número considerable, 67 del total (26%) estaban implicados en desarrollo (Berardini y col., 2004).

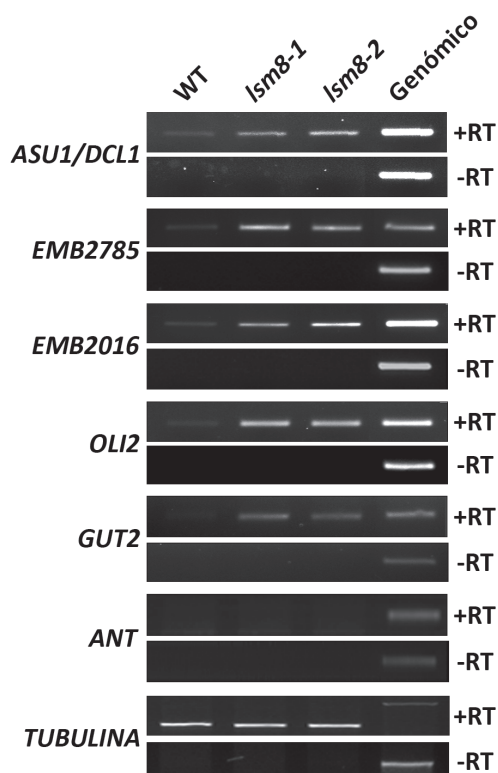


Figura 24. Retención de intrones en genes implicados en el desarrollo de *Arabidopsis* en ausencia del complejo LSM2-LSM8.

Validación de los eventos de retención de intrones en genes implicados en procesos de desarrollo detectados en el mutante *lsm8-1*. Se realizaron RT-PCRs con RNA total de plantas WT, *lsm8-1* y *lsm8-2* de 2 semanas, y oligonucleótidos específicos para cada intrón. En todos los casos, uno de los oligonucleótidos estaba situado dentro del intrón retenido y el otro en uno de los exones adyacentes. +RT indica reacciones de retrotranscripción. Como controles se utilizaron DNA genómico (Genómico) y RNAs sin retrotranscribir (-RT). La expresión del gen *TUBULINA* se utilizó como control de carga.

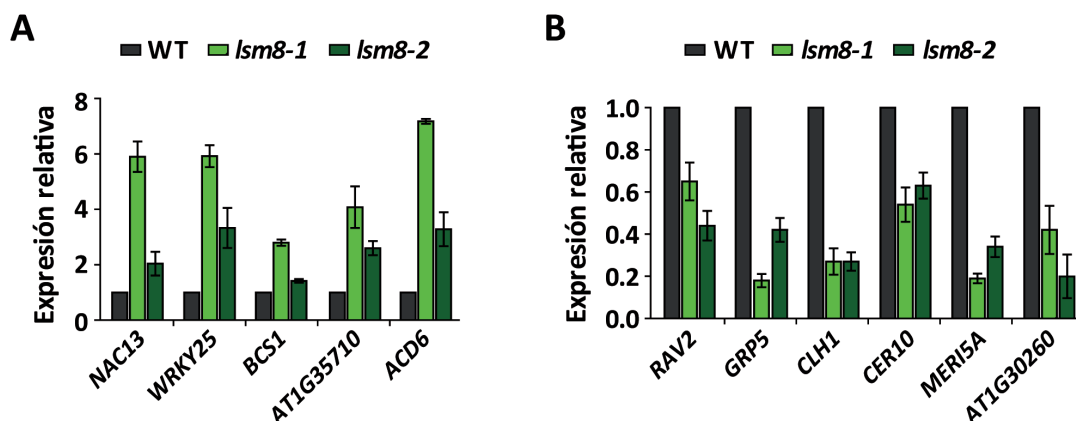


Figura 25. Alteraciones en la expresión de genes implicados en el desarrollo de Arabidopsis en ausencia del complejo LSM2-LSM8.

Validación de los niveles de expresión de genes implicados en el desarrollo detectados en el mutante *lsm8-1*. El análisis de genes cuya expresión era más alta (A) o más baja (B) en los mutantes *lsm8* se realizó mediante qRT-PCR. Se utilizó RNA total de plantas WT, *lsm8-1* y *lsm8-2* de 2 semanas, y oligonucleótidos específicos para cada gen.

Estos resultados de expresión génica fueron validados mediante qRT-PCR en los mutantes *lsm8* para algunos genes. Entre los genes que aparecían más elevados se comprobaron *NAC DOMAIN PROTEIN 13* (*NAC13*), implicado en el desarrollo multicelular (Lamesch y col., 2012), *WRKY DNA-BINDING PROTEIN 25* (*WRKY25*), cuya sobreexpresión afecta negativamente al tamaño de la planta y acelera la floración (Li y col., 2011), *CYTOCHROME BC1 SYNTHESIS* (*BCS1*) cuya sobreexpresión afecta al desarrollo de las hojas (Zhang y col., 2014), una proteína quinasa (*AT1G35710*) y *ACCELERATED CELL DEATH 6* (*ACD6*), cuya sobreexpresión también afecta negativamente al tamaño de las plantas (Heil y Baldwin, 2002) (Figura 25A). De entre los genes con menor expresión en el mutante *lsm8-1*, se comprobaron *RELATED TO ABI3/VP1 2* (*RAV2*), que afecta a la floración (Castillejo y Pelaz, 2008), *GLYCINE-RICH PROTEIN 5* (*GRP5*), *CHLOROPHYLLASE 1* (*CLH1*) y *ECERIFERUM 10* (*CER10*), cuyos mutantes tienen menor tamaño que el WT (Kariola y col., 2005; Zheng y col., 2005; Mangeon y col., 2009), y *MERISTEM 5* (*MER15*) y *AT1G30260*, cuya expresión responde a giberelinas y brasinoesteroides, y a citoquininas, respectivamente (Kauschmann y col., 1996; Brenner y col., 2005) (Figura 25B).

En su conjunto, todos estos resultados indican que el complejo nuclear LSM2-LSM8 regula el correcto desarrollo de Arabidopsis, controlando el *splicing* y asegurando los niveles de expresión de numerosos genes de desarrollo.

3.4. El complejo nuclear LSM2-LSM8 regula negativamente la respuesta de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis

3.4.1. Los mutantes *lsm8* tienen mayor capacidad de aclimatar a las temperaturas bajas que las plantas WT

El hecho de que los transcritos de las proteínas LSMs se acumularan en respuesta a las temperaturas bajas, sugería que el complejo LSM2-LSM8 podía estar implicado en el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas, regulando por tanto, el desarrollo de la tolerancia de Arabidopsis a las heladas. Para estudiar esta posibilidad, analizamos la tolerancia a las temperaturas de congelación de los mutantes *lsm8*. En un primer ensayo, se analizó la tolerancia constitutiva de los mutantes, para lo cual las plantas fueron sometidas a diferentes temperaturas bajo cero durante 5 horas, y tras una semana de recuperación se evaluó su supervivencia. En un segundo ensayo, se analizó su tolerancia a las heladas después de haber sido aclimatadas. Para ello, las plantas fueron expuestas a 4°C durante 7 días, y posteriormente fueron sometidas a diferentes temperaturas de congelación, tras lo que se evaluó su supervivencia después de una semana de recuperación. La tolerancia a la congelación se determinó, en ambos casos, como el porcentaje de supervivencia a cada temperatura (Figuras 26A y 26B). Las plantas WT y los mutantes *lsm8* sin aclimatar mostraban una tolerancia a la congelación semejante (Figura 26C), siendo la LT_{50} (temperatura a la que la mortalidad es del 50%) de -6°C para los tres genotipos (Figura 26A). Cuando las plantas habían sido aclimatadas previamente a 4°C, sin embargo, los mutantes presentaban mayor supervivencia que las plantas WT (Figura 26D). En este caso, mientras que la LT_{50} del WT era de -8°C, la LT_{50} de los mutantes *lsm8* bajaba hasta -9°C (Figura 26B). Estos datos indicaban que LSM8, y por tanto el complejo nuclear LSM2-LSM8, regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en Arabidopsis, pero no está implicado en su tolerancia constitutiva a las temperaturas de congelación.

3.4.2. El complejo nuclear LSM2-LSM8 es necesario para el correcto *splicing* de genes regulados por temperaturas bajas

Dado que los mutantes *lsm8* presentaban una mayor capacidad de aclimatar que las plantas WT y el complejo LSM2-LSM8 estaba implicado en la correcta eliminación de los intrones de los pre-mRNAs, decidimos estudiar si este complejo podía ser necesario para el *splicing* de genes regulados por frío. Con este objetivo, analizamos si en respuesta a las temperaturas bajas se producía una retención específica de intrones en los mutantes *lsm8*, hibridando la micromatriz de genoma completo tipo *tiling* con RNAs totales de plantas WT y *lsm8-1* expuestas a 4°C durante 24 horas. Los resultados permitieron identificar, en el mutante, 547 intrones retenidos en 525 genes (Tabla IV, Anexo I). Es de destacar, que 210 de esos 525 genes (40%) están regulados por temperaturas bajas (21% se inducen y

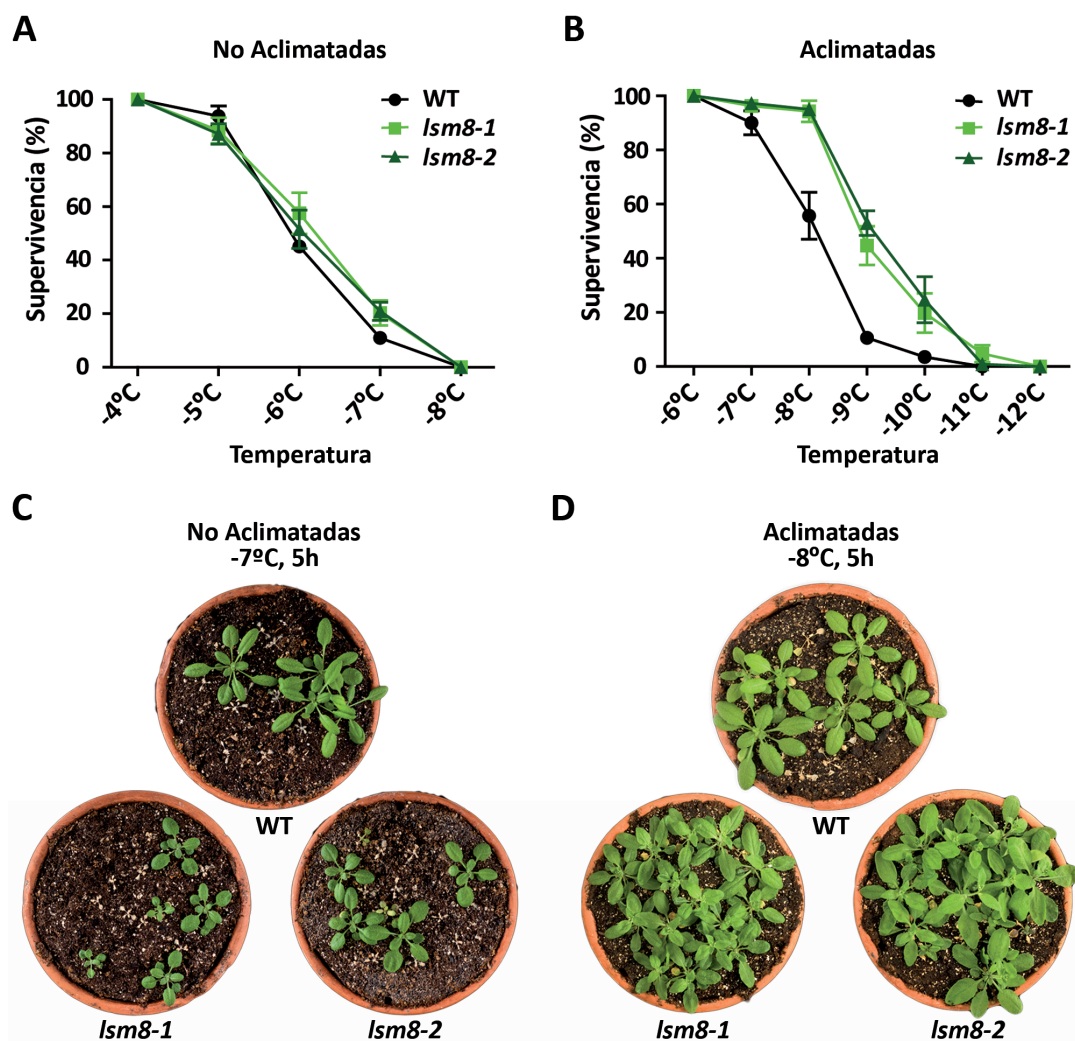


Figura 26. Tolerancia a las temperaturas de congelación de los mutantes *lsm8*.

A-B. Plantas WT, *lsm8-1* y *lsm8-2* de dos semanas de edad se congelaron a diferentes temperaturas durante 5 horas. Se representan las medias y la desviación estándar de, al menos, 3 experimentos independientes con un mínimo de 15 plantas por genotipo cada uno. **A.** Porcentajes de supervivencia de plantas no aclimatadas. **B.** Porcentajes de supervivencia de plantas aclimatadas durante 7 días a 4°C. **C.** Foto representativa de plantas no aclimatadas y congeladas a -7°C durante 5 horas, tras una semana de recuperación. **D.** Foto representativa de plantas aclimatadas y congeladas a -8°C durante 5 horas, tras una semana de recuperación.

19% se reprimen) (Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006; Matsui y col., 2008). El análisis ontológico de los genes regulados por temperaturas bajas reveló un ligero enriquecimiento en genes que codifican proteínas de localización nuclear (80) y cloroplástica (37), respectivamente (Berardini y col., 2004). Se validaron mediante RT-PCR los eventos de retención de intrones en algunos de los genes regulados por temperaturas bajas como *EMBRYONIC FLOWER 2* (*EMF2*), *PSEUDORESPONSE REGULATOR 5* (*PRR5*), *HISTONE DEACETYLASE 2* (*HDA2*), una exonucleasa 5'-3' (*AT1G34380*),

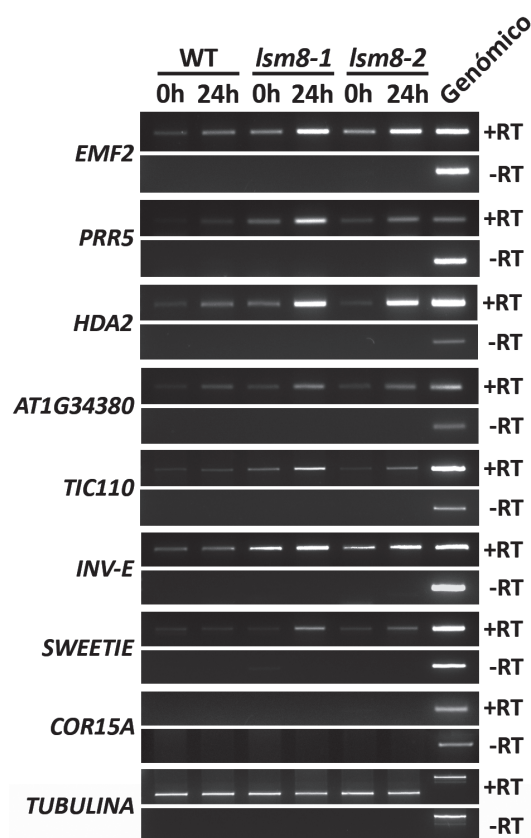


Figura 27. Retención de intrones en genes regulados por frío en respuesta a temperaturas bajas en ausencia del complejo LSM2-LSM8 de Arabidopsis.

Validación de los eventos de retención de intrones detectados en el mutante *lsm8-1* en genes regulados por frío. Se realizaron RT-PCRs con RNA total de plantas WT, *lsm8-1* y *lsm8-2* de 2 semanas, en condiciones control (0h) o expuestas 24 horas a 4°C (24h), y oligonucleótidos específicos para cada intrón. En todos los casos, uno de los oligonucleótidos estaba situado dentro del intrón retenido y el otro en uno de los exones adyacentes. +RT indica reacciones de retrotranscripción. Como controles se utilizaron DNA genómico (Genómico) y RNAs sin retrotranscribir (-RT). La expresión del gen *TUBULINA* se utilizó como control de carga.

TIC110, *ALKALINE/NEUTRAL INVERTASE-E (INV-E)* y *SWEETIE* (Figura 27). De estos genes *EMF2*, *PRR5*, *HDA2* y la exonucleasa 5'-3' son nucleares, *TIC110* y *INV-E* codifican componentes del cloroplasto, y *SWEETIE* codifica una proteína citosólica. *EMF2* reprime a los reguladores positivos de la aclimatación *LONG VEGETATIVE PHASE1 (LOV1)* y *GIGANTEA (GI)*, *PRR5* también se ha descrito como regulador negativo de la aclimatación (Kim y col., 2010; Guan y col., 2013), *HDA2* pertenece al regulón de *ICE1* (Lee y col., 2005) y el gen que codifica la exonucleasa 5'-3' está regulado por frío (Laubinger y col., 2008b). En lo que respecta a los genes que codifican proteínas de localización en el cloroplasto, su elevado número podría reflejar ajustes fotosintéticos en respuesta a las temperaturas bajas para mantener el equilibrio energético. Además, *TIC110* e *INV-E*, junto con *SWEETIE*, han sido implicados en el metabolismo y almacenamiento de almidón (Inaba y col., 2005; Vargas y col., 2008; Veyres y col., 2008). Como control negativo se analizó el intrón 2 de *COLD REGULATED 15A (COR15A)*, un gen que también está relacionado con la respuesta de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas (Lin y Thomashow, 1992) para el que no se había detectado retención de intrones en el mutante *lsm8-1* expuesto a frío en las micromatrices. En todos los casos, los intrones presentaban una mayor amplificación por RT-PCR en ambos alelos *lsm8* que en el WT tras 24 horas de exposición a 4°C (Figura 27). En algunos de los genes validados, como *EMF2* e *INV-E*, se observó, también, una mayor amplificación en los mutantes *lsm8* que en las plantas WT en condiciones control, aunque siempre menor que tras la exposición a 4°C (Figura 27).

Por tanto, en respuesta a las temperaturas bajas, el complejo LSM2-LSM8 de *Arabidopsis* controla el *splicing* de pre-mRNAs correspondientes a genes regulados por este estrés abiótico.

3.4.3. El complejo LSM2-LSM8 regula la expresión génica en respuesta a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*

El análisis de la expresión génica global en el mutante *lsm8-1* en respuesta a las temperaturas bajas, a partir de las hibridaciones llevadas a cabo con las micromatrices de genoma completo, reveló que un total de 220 genes se expresaban de forma significativamente diferente en el mutante *lsm8-1*. De ellos, 87 estaban más altos y 133 más bajos respecto al WT, al menos 2 veces (Tabla V, Anexo I). Un 46% (101) de los genes desregulados en el mutante *lsm8-1* en respuesta a 4°C eran genes cuya expresión está controlada por frío (Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006; Matsui y col., 2008). Entre los genes con mayor expresión en el mutante *lsm8-1* se encontraron 10 que codifican factores de transcripción (11%), más del doble respecto al porcentaje de factores de transcripción codificados en el genoma de *Arabidopsis* (4%), de los que 9 han sido descritos como regulados por frío (Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006; Matsui y col., 2008; Zeller y col., 2009). El aumento de expresión de tres de estos factores: *bZIP60*, implicado en la respuesta a estrés del retículo endoplásmico y cuya sobreexpresión en *Oryza sativa* confiere mayor tolerancia al frío (Tang y Page, 2013), *SZF1*, que está regulado por frío a través de ICE1 (Lee y col., 2005), y *WRKY33*, involucrado en diferentes respuestas a estrés abiótico (Jiang y Deyholos, 2009; Li y col., 2011) (Figura 28A), fue validado mediante qRT-PCR. Del resto de genes regulados por frío que presentaban mayor expresión en el mutante, se validó la expresión de *GIGANTEA* (*GI*), *ALTERNATIVE OXIDASE 1A* (*AOX1A*), *NAD(P)H DEHYDROGENASE B2* (*NDB2*) y *mitochondrial HEAT SHOCK PROTEIN70-1* (*mtHSC70-1*) (Figura 28B). Se ha descrito que *GI* actúa como un regulador positivo de la tolerancia a la congelación en *Arabidopsis* (Cao y col., 2005) y *AOX1A* se ha relacionado con el aumento de tolerancia a las temperaturas bajas en esa misma especie (Fiorani y col., 2005). Los productos de *AOX1A*, así como de *NDB2* y *mtHSC70-1* se localizan en la mitocondria. Estos tres genes se inducen en respuesta a temperaturas bajas pudiendo estar implicados en el control del daño oxidativo (Van Aken y col., 2009; Zhou y col., 2012). La expresión en respuesta a temperaturas bajas de todos los genes validados fue más alta en los alelos *lsm8* que en las plantas WT (Figura 28A y B).

De los genes con menor expresión en el mutante *lsm8-1*, destacaba el que codifica la *PROTEIN PHOSPHATASE 2CA* (*PP2CA*), ya que es un regulador negativo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas (Tähtiharju y Palva, 2001). El análisis de la expresión de *PP2CA* mediante qRT-PCR confirmó que, efectivamente, en el mutante *lsm8-1* no aumentaban los niveles de transcritos de *PP2CA* en respuesta a 4°C. En el mutante *lsm8-2*, la inducción era mucho menor en comparación con la que se produce en el WT (Figura 28C). Por otra parte, entre los genes que presentaban una menor expresión en el

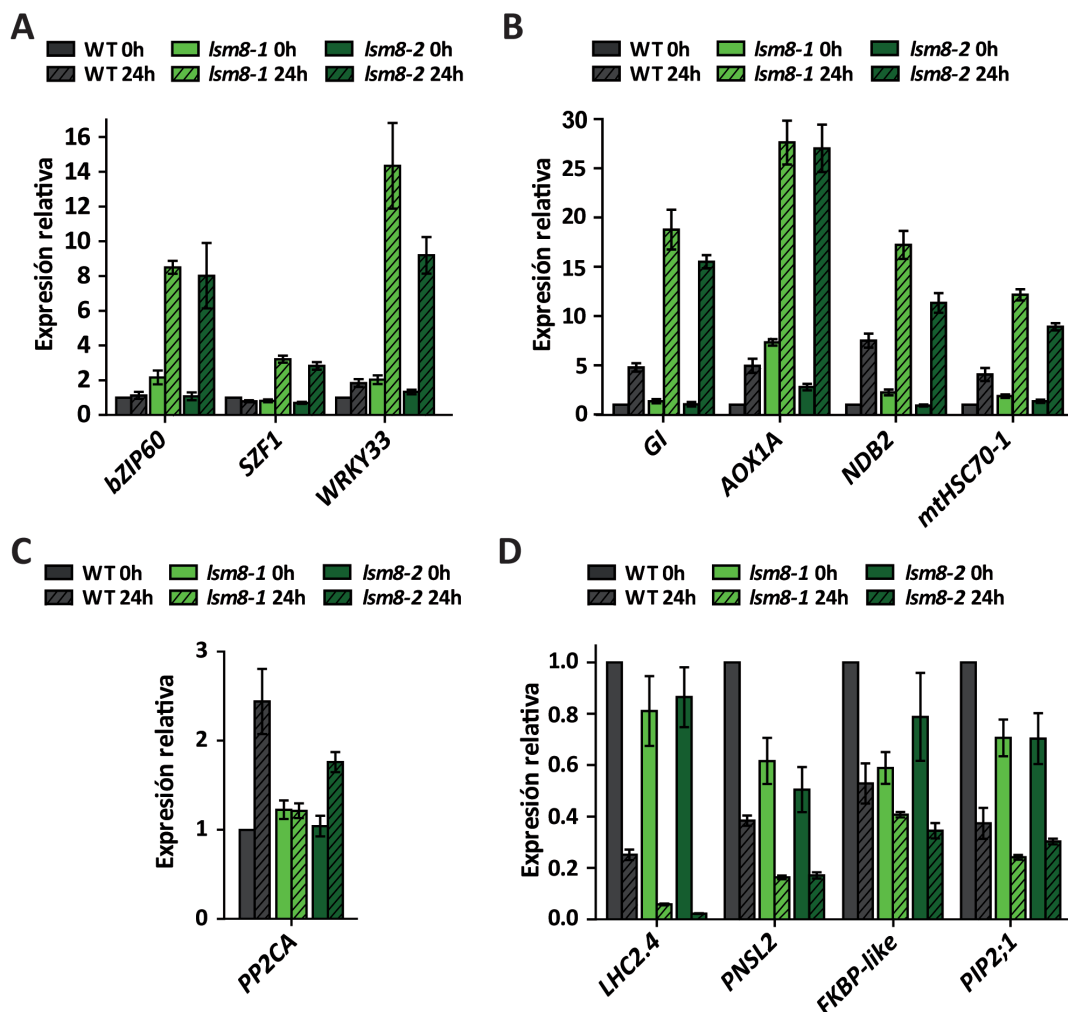


Figura 28. Alteraciones en la expresión de genes regulados por frío en ausencia del complejo LSM2-LSM8 de *Arabidopsis* en respuesta a temperaturas bajas.

Validación de los niveles de expresión de genes regulados por frío con mayor (A-B) o menor (C-D) expresión detectados en el mutante *lsm8-1* respecto al WT tras la exposición a 4°C. Los análisis de expresión se realizaron mediante qRT-PCR. Se utilizó RNA total de plantas WT, *lsm8-1* y *lsm8-2* de 2 semanas, en condiciones control (0h) o expuestas 24 horas a 4°C (24h), y oligonucleótidos específicos para cada gen. **A.** Niveles de expresión de diferentes factores de transcripción. **B.** Niveles de expresión de *Gl* y genes que codifican componentes mitocondriales (*AOX1A*, *NDB2* y *mtHSC70-1*). **C.** Niveles de expresión de *PP2CA*. **D.** Niveles de expresión de genes que codifican componentes del cloroplasto

mutante *lsm8-1* era significativo un enriquecimiento de aquellos que codifican proteínas de localización en el cloroplasto (35%, frente al 13% del total en *Arabidopsis*). El 62% de estos genes se ha descrito que están regulados por frío, en su mayoría de forma negativa (Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006; Matsui y col., 2008), lo que, como ya se ha comentado, permitiría ajustar el aparato fotosintético en respuesta a las temperaturas bajas. La expresión de varios de estos genes (*PHOTOSYSTEM II LIGHT HARVESTING*

COMPLEX GENE 2.4 (LHCB2.4), *PHOTOSYNTHETIC NDH SUBCOMPLEX L 2 (PNSL2)*, *FKBP-LIKE PEPTIDYL-PROLYL CIS-TRANS ISOMERASE FAMILY PROTEIN (FKBP-like)* y *PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN 2A (PIP2;1)*) también se validó mediante qRT-PCR. En todos los casos se observó su represión en respuesta a frío en las plantas WT, siendo aún mayor en los mutantes *lsm8-1* y *lsm8-2* (Figura 28D). Todos estos resultados permiten concluir que el complejo LSM2-LSM8 controla la expresión génica regulada por frío durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

4. DISCUSIÓN

El aislamiento y caracterización de genes cuya expresión está regulada durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas puede aportar información sobre los mecanismos moleculares responsables de la tolerancia de las plantas a las heladas. Este es el caso de *RCI6*, un gen de *Arabidopsis* cuyos transcritos aumentan específicamente en respuesta a frío. *RCI6* codifica la proteína LSM2, perteneciente a una familia de 8 proteínas (LSM1 a LSM8) implicadas en el metabolismo de RNA no caracterizada en plantas. La proteína LSM2, en levaduras y humanos, forma parte de dos complejos muy similares en composición que se diferencian por su localización subcelular, su actividad y la presencia de la proteína LSM1 o LSM8. La caracterización molecular y funcional de LSM8 nos ha permitido establecer que en *Arabidopsis* existe un complejo nuclear, LSM2-LSM8, análogo al de levaduras y humanos, que interviene en el *splicing* de los pre-mRNAs. Además, hemos demostrado que este complejo juega un papel esencial en el correcto desarrollo de *Arabidopsis*, controlando el *splicing* de genes relacionados con distintas etapas del mismo. Más relevante aún es la función que hemos podido asignar al complejo LSM2-LSM8 en el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis*, asegurando el *splicing* y la adecuada expresión génica durante esta respuesta adaptativa.

En *Arabidopsis* existe un complejo nuclear de LSMs funcionalmente equivalente al de humanos y levaduras

En humanos y levaduras, se ha descrito la existencia de 8 proteínas LSMs que forman 2 complejos heptaméricos análogos con diferente función y localización subcelular. Un complejo citoplásmico, LSM1-LSM7, que participa en la degradación de los mRNAs, y un complejo nuclear, LSM2-LSM8, que forma parte del espliceosoma. En *Arabidopsis*, mediante búsquedas bioinformáticas utilizando las secuencias de humanos y levaduras, se han identificado 11 genes que codifican estas 8 proteínas, ya que los genes que codifican LSM1, LSM3 y LSM6 están duplicados (Wang y Brendel, 2004). Estudios filogenéticos han permitido establecer que las LSMs pertenecen a una gran familia de proteínas presente en todos los reinos (arqueobacterias, procariotas y eucariotas), cuyo origen se remontaría al último antepasado común universal (LUCA) (Anantharaman y col., 2002; Veretnik, y col., 2009). En LUCA, habría aparecido una proteína con el motivo Sm que en eucariotas habría dado lugar a los diferentes subtipos, LSM1 a LSM8, mediante duplicaciones y posterior divergencia evolutiva (Anantharaman y col., 2002; Veretnik y col., 2009). Nuestros resultados indican que las LSMs de *Arabidopsis* encajarían en este esquema en el que los diferentes subtipos se habrían formado previamente a la radiación de los eucariotas a partir de un antecesor común. Además, en el linaje de *Arabidopsis* se han producido las duplicaciones de 3 de los genes *LSM*, *LSM1*, *LSM3* y *LSM6*. Este aumento en el número de genes *LSM* también se ha producido en otras especies vegetales como *Zea mays*, *Populus thricocarpa*, *Oryza sativa* o *Glycine max*, reflejando los diferentes eventos de duplicación genómica y/o génica, reordenaciones y deleciones sufridos en el reino vegetal (Proost y col., 2011).

Los resultados de los estudios de localización subcelular y BiFC respaldan la formación en *Arabidopsis* de un complejo nuclear de LSMs compuesto por las proteínas LSM2 a LSM8. La proteína LSM8 de *Arabidopsis* se localiza específicamente en el núcleo de las células, mientras que la proteína LSM4 se localiza simultáneamente en el núcleo y en el citoplasma, al igual que ocurre en levaduras (Beggs, 2005). Estas localizaciones han sido corroboradas recientemente por Golisz y col. (2013). Además, las interacciones de LSM8 con el resto de proteínas LSMs sugieren la formación de un complejo nuclear (LSM2-LSM8) con un orden específico similar al descrito para levaduras (Zhou y col., 2014). Por otro lado, nuestros resultados han puesto de manifiesto que en *Arabidopsis*, al igual que sucede en levaduras (Spiller y col., 2007b), la proteína LSM8 es esencial para la formación del complejo nuclear, como lo demuestra la deslocalización hacia el citoplasma de la proteína LSM4 en los mutantes *lsm8-1*.

Estudios genéticos y moleculares nos han permitido establecer que, en *Arabidopsis*, el complejo LSM2-LSM8 tiene la misma función molecular que en humanos y levaduras: estabiliza específicamente el U6 snRNA y controla el *splicing* de numerosos genes (Beggs, 2005). Las plantas deficientes en LSM8 muestran menores niveles de U6 snRNA, disminución que también hemos detectado en el mutante *lsm4-1* y en los dobles mutantes *lsm3a lsm3b* y *lsm6a lsm6b* (Hernández-Verdeja y col., en preparación), y ha sido descrita en el mutante *sad1*, mutante puntual de EMS en LSM5 (Golisz y col., 2013). Los niveles de U6 snRNA no varían, sin embargo, en los dobles mutantes *lsm1a lsm1b* deficientes en las proteínas LSM1, lo que indica que la estabilidad del U6 snRNA depende específicamente de las proteínas LSM que forman el complejo nuclear. Por otra parte, el efecto negativo sobre los niveles de U6 snRNA que ocasiona la falta de alguna de las proteínas LSMs del complejo nuclear es específico, y no afecta a otros snRNAs que forman parte de las ribonucleoproteínas del espliceosoma. Los niveles bajos de U6 snRNA que se observan en ausencia del complejo nuclear de LSMs tampoco parecen ser debidos a problemas en su transcripción, ya que los niveles de U3 snoRNA, que es transcrito por la misma polimerasa que el U6 snRNA, la RNA polimerasa III, no disminuyen en ninguno de los mutantes. Golisz y col. (2013) han demostrado, mediante inmunoprecipitación, que en *Arabidopsis*, al igual que en levaduras, el U6 snRNA interacciona con LSM8, lo que es consistente con el hecho de que el complejo LSM2-LSM8 lo estabilice.

Como consecuencia de los menores niveles de U6 snRNPs, la eficiencia y fidelidad del ensamblaje del espliceosoma en los mutantes *lsm8* estaría alterada, provocando defectos en el *splicing* de numerosos genes. Comparado con el WT, en el mutante *lsm8-1* hemos detectado intrones retenidos en 453 genes. Considerando que el complejo LSM2-LSM8 forma parte del núcleo del espliceosoma este número puede resultar escaso. El tipo de micromatriz de genoma completo utilizada (*Affymetrix Arabidopsis Tiling 1.0R*) y el tipo de análisis de los resultados que se ha realizado podría contribuir a la subestimación. El estudio del mutante puntual en LSM5, *sad1*, realizado mediante secuenciación masiva

de RNA, reveló retención de intrones en 2246 genes (Cui y col., 2014), lo que sugiere que el complejo nuclear de LSMs de *Arabidopsis* controlaría al *splicing* de intrones en muchos más transcritos de los que nosotros hemos detectado. Además, el análisis de resultados de la micromatriz de genoma completo utilizada (*Affymetrix Arabidopsis Tiling 1.0R*) solo permite la detección, con fiabilidad, de eventos de retención de intrones (Ner-Gaon y Fluhr, 2006), por lo que no podemos descartar que en los mutantes *lsm8-1* no se produzcan otros defectos en el *splicing* de los mRNAs como eliminación de exones, o sitios de corte alternativos en 3' o 5'. No obstante, la retención de intrones parece ser la alteración más común que se produce en el *splicing* de los transcritos de plantas (Syed y col., 2012), por lo que este podría ser el defecto de *splicing* más numeroso en ausencia del complejo nuclear LSM2-LSM8. Esta hipótesis cobra fuerza a la luz de los resultados obtenidos mediante secuenciación masiva de RNA en el mutante *sad1* (Cui y col., 2014). En este estudio, además de los eventos de retención de intrones ya mencionados se han detectado otros tipos de alteraciones en el *splicing* de los transcritos, aunque en menor número (Cui y col., 2014). Estos resultados indican que el complejo LSM2-LSM8, como cabría esperar dado que forma parte del núcleo del espliceosoma, controla el *splicing* no solo a nivel de eliminación de intrones, si no que, además, determina la elección de los sitios de corte en 5' y 3', y la retención de exones.

Con objeto de establecer si el complejo nuclear LSM2-LSM8 aporta especificidad al proceso de *splicing*, comparamos los genes afectados en el mutante *lsm8-1* con los de otros mutantes de *splicing* para los que se ha analizado la retención de intrones en condiciones de crecimiento control. Este es el caso del ya mencionado *sad1* (Cui y col., 2014), de *ski-interacting protein/pre-mrna processing factor 45* (*skip/prp45*) (Wang y col., 2012b) y de *rna-directed dna methylation/pre-mrna processing factor 3* (*rdm16/prp3*) (Huang y col., 2013). La comparación de los genes cuyo *splicing* regula LSM8 con los genes que regulan las otras 3 proteínas (SAD1, SKIP/PRP45 y RDM16/PRP3), revela pocas coincidencias (Figura 29A), si bien, en algunos casos, como entre SAD1 y LSM8, SAD1 y SKIP/PRP45 o SAD1 y RDM16/PRP3, son ligeramente mayores de lo que se esperaría si fueran debidas al azar (Figura 29B). La falta de solapamiento entre los genes controlados por estos componentes del espliceosoma sugiere que cada una de ellos podría regular o participar de forma específica, controlando el procesamiento de pre-mRNAs determinados. No se puede descartar, sin embargo, que el bajo número de genes en común sea debido a las diferencias en las condiciones experimentales y/o el estadio de desarrollo de las plantas utilizadas en cada estudio.

Como era de esperar dada su función en el procesamiento de RNAs mensajeros, el complejo LSM2-LSM8 juega un papel en la regulación de la expresión génica en *Arabidopsis*. En los mutantes *lsm8-1* hemos detectado 250 genes con la expresión desregulada respecto al WT, siendo mayor el número de genes que muestran una expresión más baja. El complejo LSM2-LSM8, por tanto, también participa en el mantenimiento de una expresión génica

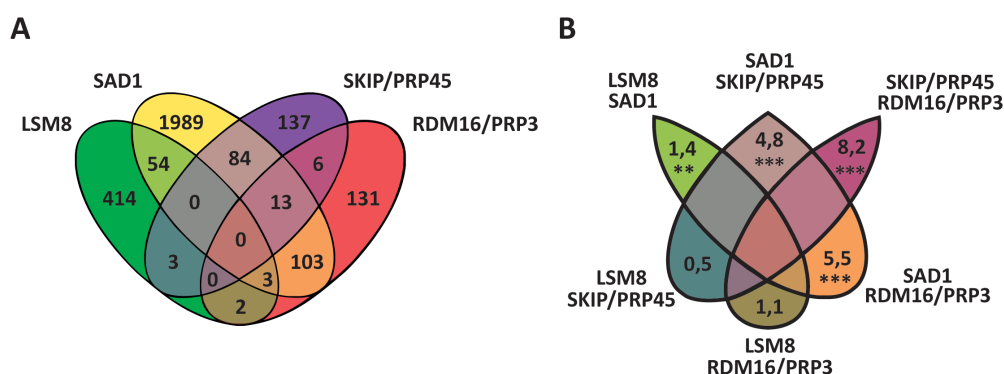


Figura 29. Comparaciones de genes cuyo *splicing* regulan diferentes componentes del espliceosoma en condiciones de crecimiento control.

A. Diagrama de Venn que muestra los genes específicos y comunes cuyo *splicing* regulan LSM8, SAD1, SKIP/PRP45 y RDM16/PRP3. **B.** Análisis del solapamiento entre los grupos de genes realizado mediante test hipergeométrico. Los valores mayores o menores de 1 indican que las coincidencias son mayores o menores de lo esperado por azar entre los dos grupos de genes comparados, respectivamente (*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001).

apropiada al igual que ocurre con otros factores implicados en el procesamiento de mRNA como RDM16/PRP3, SAD1 o SKIP/PRP45 (Xiong y col., 2001b; Wang y col., 2012b; Huang y col., 2013). Curiosamente, ninguno de los genes en los que se han detectado defectos en el *splicing* se encuentra entre estos genes con menor expresión, indicando que la alteración de la expresión génica observada en las plantas *lsm8-1* es un resultado indirecto de los defectos en el *splicing*. La clasificación ontológica de los genes cuyo *splicing* y expresión controla el complejo nuclear LSM2-LSM8 revela que están implicados en diversos procesos biológicos (Figura 30) (Berardini y col., 2004). Es remarcable el enriquecimiento en las categorías de procesos de desarrollo y respuesta a estrés biótico y abiótico, sugiriendo la implicación de este complejo tanto en el desarrollo de *Arabidopsis* como en su respuesta a estrés.

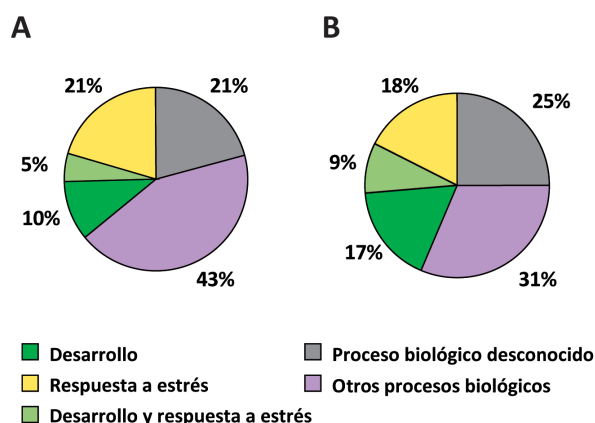


Figura 30. Clasificación ontológica de genes cuyo *splicing* o expresión controla el complejo LSM2-LSM8. Porcentajes de genes implicados en procesos de desarrollo, respuesta a estrés, otros procesos, o con función biológica desconocida cuyo *splicing* (A) o expresión (B) controla el complejo nuclear de LSMs en condiciones de crecimiento control.

El complejo nuclear LSM2-LSM8 es necesario para el correcto desarrollo de Arabidopsis

En levaduras y células de tripanosoma, la proteína LSM8 y otras LSMs que forman parte del complejo nuclear son esenciales para el crecimiento (Mayes y col., 1999; Liu y col., 2004). En Arabidopsis, varias proteínas que forman parte del espliceosoma, como PRE-MRNA PROCESSING FACTOR 6 (PRP6), PRE-MRNA PROCESSING FACTOR 8A/ABNORMAL SUSPENSOR 2 (PRP8A/SUS2), LACHESIS/PRE-MRNA PROCESSING FACTOR 4 (LIS/PRP4) o GAMETOPHYTIC FACTOR 1 (GFA1), entre otras (Tabla V, Anexo I), también son esenciales para el desarrollo y su ausencia es letal a nivel embrionario (Groß-Hardt y col., 2007; Meinke y col., 2008; Liu y col., 2009). Las plantas deficientes en LSM8, aunque viables, muestran alteraciones importantes en su desarrollo tanto vegetativo como reproductivo, indicando que esta proteína es necesaria durante todas las fases del ciclo de vida de Arabidopsis. Mutantes de inserción de T-DNA en los genes *LSM4* y *LSM7* son letales embrionarios (Meinke y col., 2008). Es más, en nuestro laboratorio hemos observado fenotipos letales postembrionarios para los dobles mutantes *lsm3a lsm3b* y *lsm6a lsm6b*, mientras que los respectivos mutantes simples tienen fenotipo WT (Hernández-Verdeja y col., en preparación). No hemos podido identificar mutantes de inserción que anulen la expresión de *LSM2* o *LSM5*, lo que hace pensar que estos dos genes también son esenciales para el desarrollo de Arabidopsis. Si que se han descrito, sin embargo, mutantes débiles para algunos de estos genes, como los mutantes *lsm4-1* con fenotipo letal postembrionario (Zhang y col., 2011) y los mutantes *sad1* que son viables pero presentan alteraciones en su desarrollo (Xiong y col., 2001b; Cui y col., 2014). Dado que las proteínas LSM2-LSM7 también forman parte del complejo citoplásmico de LSMs junto con LSM1A o LSM1B, implicado en la degradación de mRNAs, los fenotipos de letalidad observados en los mutantes correspondientes no se pueden asociar únicamente con la disrupción del complejo nuclear y su papel en el *splicing* de los pre-mRNAs. La caracterización de los dobles mutantes *lsm1a lsm1b*, realizada en nuestro laboratorio, ha revelado que, aunque viables, también tienen defectos severos en su desarrollo, como sucede con los mutantes *lsm8* (Perea-Resa y col., 2012). Los triples mutantes *lsm1a lsm1b lsm8* son letales postembrionarios (Hernández-Verdeja y col., en preparación), lo que sugiere que en Arabidopsis es necesaria la presencia de al menos uno de los dos complejos de proteínas LSMs para la viabilidad de la planta.

Como acabamos de comentar, la ausencia de función de LSM8 causa diversos defectos en el desarrollo de Arabidopsis, al igual que sucede con otras mutaciones viables en genes que codifican componentes del espliceosoma (Tabla V, Anexo I). Entre las anomalías detectadas durante el desarrollo de los mutantes *lsm8*, hay que destacar aquellas que tienen origen durante el desarrollo embrionario, como son el número de cotiledones y su patrón vascular. En los mutantes *lsm8* hay un alto porcentaje de plántulas con 3 cotiledones con respecto al WT. Este fenotipo también se ha descrito para plantas deficientes en otros

componentes del espliceosoma (Tabla V, Anexo I) y lo hemos observado en los mutantes *lsm4-1* y *sad1* (Hernández-Verdeja y col., en preparación). Se ha descrito que los patrones vasculares están simplificados en mutantes relacionados con el *splicing* (Tabla V, Anexo I) y también en mutantes relacionados con la degradación de RNAs (Xu y col., 2006; Goeres y col., 2007; Petricka y col., 2008; Casson y col., 2009). Los dobles mutantes *lsm1a lsm1b*, deficientes en el complejo citoplásmico de LSMs, también presentan los haces vasculares de los cotiledones más simplificados (Perea-Resa y col., 2012) al igual que sucede en *lsm4-1* y *sad1* (Hernández-Verdeja y col., en preparación). Sin embargo, en ausencia de LSM8 los patrones vasculares están mejor definidos que en el WT. En levaduras, se ha descrito que las proteínas LSM8 y LSM1 actúan de forma competitiva para formar los complejos nuclear y citoplásmico de LSMs, de forma que en ausencia de LSM8 se forman más complejos LSM1-LSM7 (Spiller y col., 2007a). Es sugerente pensar que en *Arabidopsis* podría estar sucediendo lo mismo, de forma que en los mutantes *lsm8* se estarían formando más complejos LSM1-LSM7, la degradación de mRNAs sería más eficiente y los haces vasculares se definirían mejor durante la fase embrionaria. No obstante, este es el único resultado de los obtenidos en nuestro trabajo que apoyaría esta hipótesis, por lo que son necesarios otros experimentos para poder corroborarla. En cuanto al desarrollo posterior de las plantas *lsm8*, en general, se observa un menor desarrollo tanto de la roseta como del sistema radicular. Está afectado el desarrollo de las hojas, que no presentan la curvatura abaxial que se observa en las WT, y son más oscuras. Los mutantes *lsm8*, además, son de floración temprana en día corto, producen silicuas más pequeñas, con menos semillas, y semillas abortadas. Por tanto, pese a que el complejo nuclear LSM2-LSM8 no parece ser esencial para el desarrollo de *Arabidopsis*, sí que es importante para que este progrese correctamente en cada estadio.

Los fenotipos causados por la ausencia de LSM8, junto con los observados en otros mutantes de *splicing* (Tabla V, Anexo I), sugieren que determinadas etapas del desarrollo son especialmente sensibles a defectos en el procesamiento de pre-mRNAs. Los datos apuntan a que el desarrollo embrionario, y concretamente la transición entre la fase globular y la fase en forma de corazón, requieren de un perfecto control del *splicing* de los pre-mRNAs para producirse correctamente. Se ha descrito un alto número de mutantes en componentes del espliceosoma que son letales embrionarios, y cuyo estadio terminal mayoritario es la fase globular (Meinke y col., 2008) (Tabla V, Anexo I). El desarrollo de los cotiledones y la simetría bilateral se produce en la fase globular tardía y en la transición a la siguiente fase de corazón (Capron y col., 2009). El aumento en la frecuencia de plantas con 3 cotiledones en los mutantes viables en genes *LSM* del complejo nuclear, así como en mutantes en otros componentes del espliceosoma como *smu1*, *smu2*, *dot2* (Petricka y col., 2008; Casson y col., 2009; Chung y col., 2009) (Tabla V, Anexo I), y en el mutante *se1* en el que se ha detectado retención de intrones (Prigge y Wagner, 2001; Laubinger y col., 2008a), también indica que en el estadio globular es muy importante el control del *splicing*. Otro momento del desarrollo que está particularmente afectado en estos mutantes es el tiempo

de floración (Tabla V, Anexo I). Se ha descrito que la regulación postranscripcional de la expresión génica juega un papel importante en el establecimiento del tiempo de floración (Quesada y col., 2005; Terzi y Simpson, 2008). Sin embargo, en este caso existen diferencias entre los distintos constituyentes del espliceosoma, hay mutantes de floración temprana, como *lsm8*, *sad1*, *skip/prp45* o *sta1* (Hernández-Verdeja y col., en preparación; Lee y col., 2006; Wang y col., 2012b) (Tabla V, Anexo I), y de floración tardía, como *smd3-b* o *prp39-1-1* (Swaraz y col., 2011; Wang y col., 2007) (Tabla V, Anexo I), lo que sugiere que existe especificidad a la hora de procesar pre-mRNAs que controlan la floración.

Los resultados del análisis de las micromatrices de genoma completo muestran la importancia de la regulación postranscripcional, concretamente la regulación del *splicing* de los pre-mRNAs, en la correcta expresión génica durante el desarrollo de *Arabidopsis*. La proteína LSM8, y por tanto el complejo nuclear LSM2-LSM8, controla el *splicing* de genes implicados en el desarrollo tanto vegetativo como reproductivo de *Arabidopsis* que podrían ser responsables de algunos de los fenotipos observados en los mutantes *lsm8*. Entre estos genes, encontramos un alto número que han sido relacionados con el desarrollo embrionario como *EMB2785*, *EMB2016*, *MALE GAMETOPHYTE DEFECTIVE 3* (*MGP3*), *ABNORMAL SUSPENSOR 2* (*SUS2*), *ENDOSPERM DEFECTIVE 1* (*EDE1*) y *CELL DIVISION CYCLE 48C* (*CDC48C*), entre otros (Meinke y col., 2008; Pignocchi y col., 2009; Tan y col., 2010). Asimismo, hallamos genes implicados en el desarrollo radicular como *INCOMPLETE ROOT HAIR ELONGATION* (*IRE*) o *ARABIDILLO-1* (Oyama y col., 2002; Coates y col., 2006), que controlan el desarrollo foliar como *OLI2* (Fujikura y col., 2009), y genes que han sido relacionados con varias fases del desarrollo de *Arabidopsis* como *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1* (*TAA1*) o *HASTY* (*HST*) (Telfer y Poethig, 1998; Stepanova y col., 2008). El complejo nuclear LSM2-LSM8, por tanto, aseguraría el *splicing* preciso de estos genes de forma que sus transcritos se procesarían para ser traducidos a proteínas funcionales. Consistentemente, el complejo nuclear de LSMs regula la expresión de genes involucrados en distintos aspectos del desarrollo de *Arabidopsis*. Entre estos genes se encuentran *ROTUNDIFOLIA LIKE 18* (*RTFL18*), que pertenece a una familia de genes que codifica péptidos pequeños implicados en el desarrollo de diferentes órganos (Wen y col., 2004), *CER10*, cuya mutación causa alteraciones en la morfología de los órganos (Zheng y col., 2005), o *EXPANSIN A5* (*EXPA5*), que pertenece a una familia de proteínas implicadas en distintos aspectos del desarrollo mediante la modificación de la pared celular (Lee y col., 2001). Nuestros resultados indican que el complejo nuclear de LSMs también controla la expresión de factores de transcripción como *RAV2*, implicado en el establecimiento del tiempo de floración y la arquitectura de la planta (Castillejo y Pelaz, 2008). Por otro lado, en los mutantes *lsm8* se expresan constitutivamente varios genes de resistencia a patógenos como *ACD6*, *PATHOGENESIS-RELATED GENE 1* (*PR1*) o *PATHOGENESIS-RELATED GENE 5* (*PR5*), cuya sobreexpresión afecta negativamente al crecimiento de *Arabidopsis* (Heil y Baldwin, 2002). Resulta obvio, sin embargo, que el número de genes afectados en los mutantes

lsm8-1 está subestimado, tanto para aquellos que presentan retención de intrones como para los que exhiben una expresión desregulada, debido a que el análisis se ha realizado utilizando únicamente rosetas de plantas de 2 semanas de edad y a las micromatrices tipo *tiling* empleadas. Cabe esperar, que el complejo LSM2-LSM8 dirija el *splicing* de genes y module la expresión génica en cada etapa del crecimiento de *Arabidopsis*, así como en cada órgano y tejido, de forma específica para que se produzca el desarrollo adecuado de las plantas.

Como se ha mencionado anteriormente, la comparación de los genes con intrones retenidos en el mutante *lsm8-1* con los genes afectados en otros mutantes de *splicing* (*sad1*, *skip/prp45*, *rdm16/prp3*) revela pocas coincidencias (Wang y col., 2012b; Huang y col., 2013; Cui, y col., 2014). El número de genes comunes es mucho menor si lo restringimos a los genes implicados en desarrollo. Estas diferencias deben ser resultado de las dispares condiciones experimentales utilizadas en cada estudio, fundamentalmente el estadio de desarrollo de las plantas y sus condiciones de crecimiento. Las diferencias detectadas en algunos fenotipos, como el tiempo de floración, sin embargo, indican que los componentes del espliceosoma actúan específicamente sobre diferentes pre-mRNAs (Tabla V, Anexo I).

Proponemos, por tanto, que el complejo LSM2-LSM8 controla el correcto *splicing* y la expresión de genes específicos, implicados en las distintas fases del desarrollo de *Arabidopsis*. Sería interesante en un futuro identificar los genes diana del complejo nuclear de LSMs en cada estadio, y qué factores determinan la especificidad los mismos.

El complejo nuclear LSM2-LSM8 controla negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis* modulando la expresión génica en respuesta a frío

El gen *LSM2* se identificó inicialmente porque sus transcritos se acumulan en respuesta a frío. Además, hemos demostrado que el resto de los transcritos que codifican las proteínas LSMs también se acumulan tras la exposición a 4°C, lo que sugiere que los complejos heptaméricos que forman podrían estar implicados en el control del proceso de aclimatación. Los resultados de los ensayos de tolerancia a la congelación de los mutantes *lsm8* demuestran que, efectivamente, el complejo nuclear LSM2-LSM8 controla el correcto desarrollo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Los mutantes *lsm8*, tras un periodo de aclimatación a 4°C, muestran mayor tolerancia a las temperaturas de congelación que las plantas WT, lo que indica que el complejo LSM2-LSM8 actúa como un regulador negativo del proceso de aclimatación. No parece estar implicado, sin embargo, en la capacidad constitutiva de *Arabidopsis* para tolerar las heladas.

Recientemente, se ha empezado a poner de manifiesto que durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas la expresión génica no está regulada solo a nivel

transcripcional (Viswanathan y Zhu, 2002; Barrero-Gil y Salinas, 2013). Diferentes estudios han revelado que la exposición a las temperaturas bajas provoca cambios en los patrones de *splicing* de numerosos genes, lo que puede afectar a su degradación, traducción, o a la actividad de las proteínas resultantes (Iida y col., 2004; Filichkin y col., 2010; Leviatan y col., 2013). Nuestros resultados han revelado nuevos mecanismos moleculares de regulación postranscripcional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación, ya que han puesto de manifiesto que el complejo LSM2-LSM8, componente del núcleo del espliceosoma, controla el *splicing* de transcritos específicos en respuesta a frío, modulando así la expresión génica y el desarrollo de la tolerancia a la congelación que tiene lugar durante este proceso adaptativo.

En respuesta a las temperaturas bajas, el complejo LSM2-LSM8 se encarga de la correcta eliminación de intrones en varios cientos de genes. Como se ha comentado anteriormente, el número de genes debe estar subestimado debido al tipo de matriz utilizada y al análisis realizado. Así mismo, como se ha determinado para SAD1 (Cui y col., 2014), el complejo LSM2-LSM8 podría intervenir, además de en la correcta eliminación de intrones, en la elección de los sitios de corte en 5' y 3', y en la inclusión de exones, que no estaríamos detectando debido a las limitaciones de las micromatrices tipo *tiling*. Entre los genes cuyo *splicing* controla el complejo LSM2-LSM8 hay un enriquecimiento significativo en genes de respuesta a estrés y en genes cuya expresión está regulada por temperaturas bajas (Figura 31) (Berardini y col., 2004; Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006; Matsui y col., 2008). Se observa, también, un ligero enriquecimiento en genes que codifican componentes del cloroplasto como *TIC110* e *INV-E*, lo que podría indicar que el complejo nuclear participa en los ajustes que se producen en este orgánulo en respuesta a frío (Figura 31). Adicionalmente, se ha descrito que *INV-E* y *TIC110*, junto con *SWEETIE*, *ALKALINE/NEUTRAL INVERTASE B (A/N-InvB)* y *PLANT GLYCOGENIN-LIKE STARCH INITIATION PROTEIN 6 (PGSIP6)*, entre otros genes cuyo *splicing* regula el complejo LSM2-LSM8, están implicados en el metabolismo o transporte de carbohidratos (Inaba y col., 2005; Vargas y col., 2008; Veyres y col., 2008). El proceso de aclimatación remodela el metabolismo de carbohidratos, aumentando los niveles de trehalosa, maltosa o sacarosa

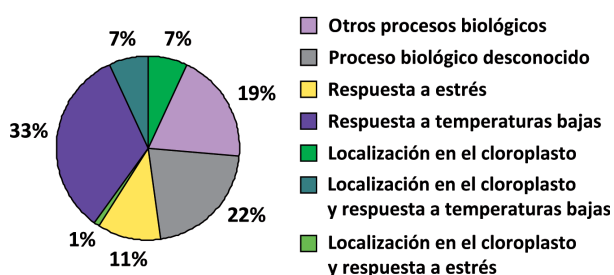


Figura 31. Clasificación ontológica de genes cuyo *splicing* controla el complejo LSM2-LSM8 en respuesta a temperaturas bajas.

Se muestran los porcentajes de genes de respuesta a estrés, regulados por temperaturas bajas, implicados en otros procesos biológicos o de función desconocida, así como aquellos que codifican proteínas de localización en el cloroplasto.

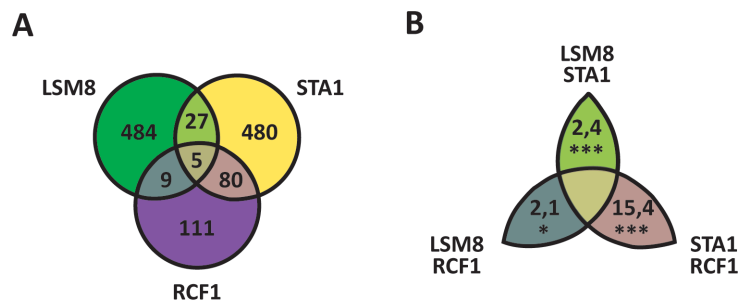


Figura 32. Comparaciones de genes cuyo *splicing* controlan LSM8, RCF1 y STA1 tras la exposición a 4°C.

A. Diagrama de Venn con los genes comunes y específicos cuyo *splicing* controlan LSM8, RCF1 y STA1. **B.** Análisis del solapamiento entre los grupos de genes realizado mediante test hipergeométrico. Los valores mayores o menores de 1 indican que las coincidencias son mayores o menores de lo esperado por azar entre los dos grupos de genes comparados, respectivamente (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)

que ejercen un efecto protector frente a la congelación (Iordachescu y Imai, 2008; Purdy y col., 2013), y de rafinosa que estabilizaría el fotosistema durante la congelación (Knaupp y col., 2011). El complejo nuclear de LSMs podría modular los cambios que se producen en el aparato fotosintético y en los niveles de azúcares durante el proceso de aclimatación. Además, el complejo LSM2-LSM8 controla el *splicing* de genes que han sido descritos como reguladores negativos de la expresión génica durante esta respuesta adaptativa, como *EMF2* y *PRR5* (Nakamichi y col., 2009; Kim y col., 2010; Guan y col., 2013). El complejo nuclear de LSMs, por tanto, participa en el desarrollo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas asegurando el *splicing* de genes que codifican proteínas cuya actividad afecta directamente a la capacidad de aclimatación, y también de genes que codifican reguladores transcripcionales de la expresión génica en respuesta a frío.

Recientemente, se ha descrito que la helicasa RCF1, junto con las proteínas del espliceosoma STA1 y BRR2B son, a diferencia del complejo nuclear LSM2-LSM8, reguladores positivos de la tolerancia a la congelación de *Arabidopsis* tanto antes como tras la aclimatación a temperaturas bajas (Guan y col., 2013). Ya se había puesto de manifiesto que en el mutante *sta1*, tras su exposición a 4°C, se acumulaban transcritos de *COR15A* con intrones retenidos (Lee y col., 2006). Ahora, los análisis transcriptómicos de genoma completo en los mutantes *rcf1* y *sta1* en respuesta a temperaturas bajas han revelado la retención de intrones en múltiples transcritos (Ben Chaabane y col., 2013; Guan y col., 2013). La comparación de los genes cuyo *splicing* controlan LSM8, RCF1 y STA1 muestra pocas coincidencias, aunque mayores de lo esperado por azar, lo que es consistente con las diferencias que muestran los mutantes en sus tolerancias a la congelación (Figura 32A y B). Como era de esperar, teniendo en cuenta que *RCF1* y *STA1* se coexpresan (Guan y col., 2013), las proteínas codificadas por estos genes son las que presentan un mayor número de genes en común, mientras que el menor número se observa para LSM8 y RCF1 (Figura

32A). Resultan interesantes los 5 genes comunes a las 3 proteínas (*PRR5*, *AT4G34150*, *AUTOPHAGY 8E*, *RADICAL-INDUCED CELL DEATH 1* y *VOLTAGE DEPENDENT ANION CHANNEL 3*) ya que podrían ser pre-mRNAs que requieren de un perfecto procesamiento durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Entre estos genes se encuentra el ya mencionado *PRR5*, que se induce en respuesta a frío y regula negativamente esta respuesta adaptativa (Nakamichi y col., 2009; Guan y col., 2013). Las diferencias existentes entre los genes cuyo *splicing* aseguran LSM8, RCF1 y STA1, y su diferente papel en la regulación del proceso de aclimatación, sugieren que los componentes del espliceosoma contribuyen al desarrollo de la tolerancia a la congelación controlando el *splicing* de transcritos específicos, aunque parte de estas diferencias también pueden ser debidas a las diferentes condiciones experimentales bajo las que se han realizado los análisis transcriptómicos. Los mecanismos que determinarían esta especificidad son desconocidos, y podrían residir tanto en las mismas proteínas del espliceosoma, como en las secuencias de los transcritos que procesan y/o en las proteínas asociadas a los pre-mRNAs que participan en su procesamiento. A pesar de que no se había descrito ningún papel para el complejo LSM2-LSM8 en el reconocimiento y/o selección de las secuencias que delimitan los intrones, recientemente se ha sugerido que SAD1 (LSM5) podría participar en la selección de los sitios de *splicing* en 5' y 3' (Cui y col., 2014). Esta selección podría ser directa o no, en cuyo caso dependería de la interacción del complejo LSM2-LSM8 con otras proteínas. Por otro lado, como se ha explicado en la Introducción (Sección 1.2.), el espliceosoma se ensambla de forma ordenada sobre cada intrón, por lo que el orden en el que se incorpora cada proteína o complejo podría determinar en que transcritos y sobre que intrones actúan preferencialmente, explicando así las diferencias existentes entre los genes cuyo *splicing* controla el complejo LSM2-LSM8 respecto a los controlados por RCF1 y/o STA1.

El complejo nuclear de LSMs, al promover el correcto *splicing* de genes como *PRR5*, *EMF2* o *CAMTA3*, que codifican factores transcripcionales, también regula la expresión génica a nivel postranscripcional en respuesta a las temperaturas bajas. Entre los genes cuya expresión es modulada por el complejo LSM2-LSM8 en esas condiciones hay un enriquecimiento en la categoría de respuesta a estrés abiótico y biótico, y un alto porcentaje de los mismos están regulados por frío (Figura 33A) (Berardini y col., 2004; Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006; Matsui y col., 2008). Es más, al analizar por separado la ontogenia de los genes cuya expresión controla positiva o negativamente el complejo nuclear de LSMs, se observan diferencias importantes en algunas categorías. Así, se observa que el complejo LSM2-LSM8 regula negativamente la inducción de un número significativamente alto de factores de transcripción que responden a temperaturas bajas (Figura 33B). Entre estos factores se encuentra *bZIP60* que activa la expresión de genes implicados en la respuesta de estrés del retículo endoplásmico (Iwata y col., 2008). Se ha demostrado que la sobreexpresión en arroz de *bZIP60* de *Arabidopsis* aumenta la tolerancia de esta especie al frío y a otros estreses abióticos (Tang y Page, 2013), lo que

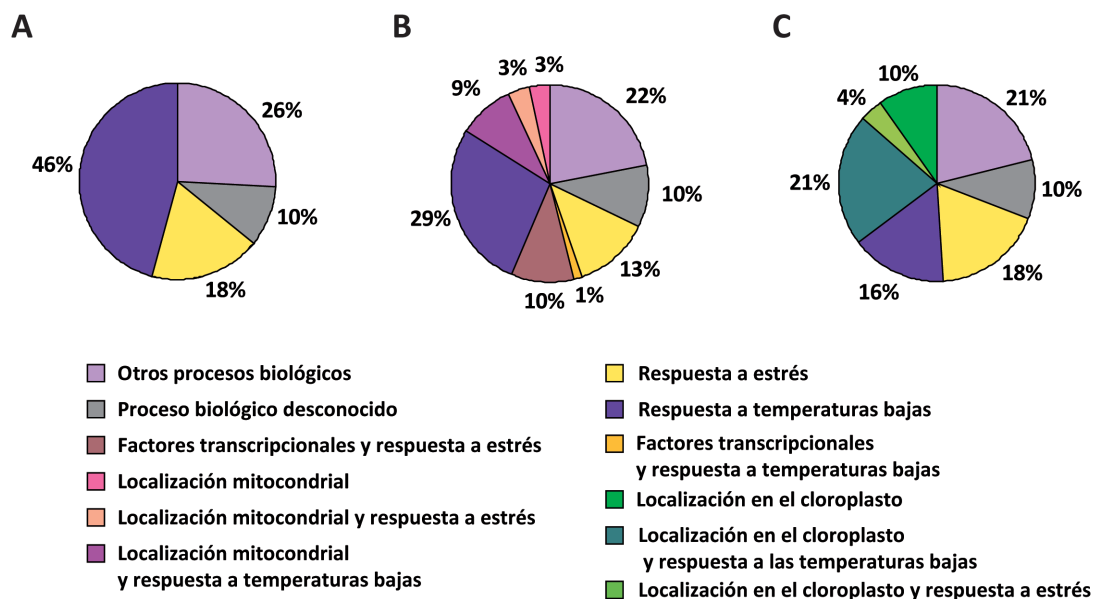


Figura 33. Clasificación ontológica de genes cuya expresión regula el complejo LSM2-LSM8 en respuesta a temperaturas bajas.

A. Porcentajes de todos los genes regulados por el complejo LSM2-LSM8 que han sido implicados en respuesta a estrés, están regulados por temperaturas bajas, han sido involucrados en otros procesos biológicos o su función es desconocida. **B.** Genes regulados negativamente. **C.** Genes regulados positivamente. En **B** y **C** se muestran, además, otras categorías significativas como genes que codifican factores de transcripción (**B**), proteínas de localización mitocondrial (**B**) o en el cloroplasto (**C**), y en cada caso los porcentajes de respuesta a estrés, a temperaturas bajas o implicados en otros procesos biológicos para cada una de estas categorías.

sugiere que podría participar en la respuesta de aclimatación en Arabidopsis. El complejo también regula de forma negativa la expresión de los genes que codifican los factores transcripcionales SARD y CBP60G, que participan en la inducción de *ISOCHORISMATE SYNTHASE 1 (ICS1)*, una enzima de la ruta de biosíntesis de ácido salicílico que es la principal responsable de su biosíntesis en respuesta a temperaturas bajas (Kim y col., 2013b), SZF1, que pertenece al regulón de ICE1 (Lee y col., 2005), y WRKY15, WRKY25 y WRKY33 que han sido relacionados con el desarrollo de la tolerancia a salinidad y a temperaturas altas en Arabidopsis (Jiang y Deyholos, 2009; Li y col., 2011). Aunque, ninguno de estos factores se ha relacionado directamente con el proceso de aclimatación, el hecho de que durante la exposición a 4°C aumenten sus niveles de transcritos sugiere que participan en la regulación transcripcional de la expresión génica durante esta respuesta adaptativa. El porcentaje significativamente alto de genes que codifican factores de transcripción que se inducen por frío y que son reprimidos por el complejo nuclear de LSMs, subraya la importancia del complejo en la modulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

El análisis detallado de los genes controlados negativamente por el complejo LSM2-LSM8 también sugiere que modera la respuesta retrógrada de la mitocondria (MRR) durante el proceso de aclimatación (Figura 33B). El estrés a nivel celular altera la función de la mitocondria que manda señales al núcleo activando respuestas transcripcionales de defensa que constituyen la MRR. El gen *AOX1A*, por ejemplo, se ha estudiado como modelo de la MRR y, además, se ha descrito como un regulador positivo de la tolerancia de *Arabidopsis* a las temperaturas bajas (Fiorani y col., 2005). Así mismo, entre los genes controlados negativamente por el complejo LSM2-LSM8 hay un ligero enriquecimiento en aquellos que codifican proteínas de localización mitocondrial y que también responden a condiciones de estrés (Van Aken y col., 2007; Van Aken y col., 2009). Hay que destacar *NDB2* que, junto con *AOX1A*, podría formar una cadena respiratoria en la mitocondria que disiparía la energía sin formar ATP (Van Aken y col., 2009). Por último, *WRKY15* y *NAC13*, otros dos de los genes cuya expresión reprime el complejo LSM2-LSM8 tras la exposición a 4°C, codifican factores de transcripción que aseguran la expresión de genes de la MRR. *NAC13* actúa como regulador positivo de la expresión génica inducida por estrés mitocondrial (Clercq y col., 2013), mientras que *WRKY15* la regula negativamente tras el tratamiento con sal (Vanderauwera y col., 2012). Por tanto, el complejo nuclear de LSMs actuaría modulando los cambios en la expresión génica producidos por la disfunción de la mitocondria para que el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas se produzca correctamente.

El complejo LSM2-LSM8 tras la exposición a 4°C también controla negativamente la expresión de genes relacionados con la biosíntesis y respuesta a SA. Así, reprime la expresión de los ya mencionados *SARD* y *CBP60G*, que codifican factores de transcripción responsables de la biosíntesis de SA en respuesta a temperaturas bajas (Kim y col., 2013b), y de genes inducibles por SA como *PR1*, *PR5*, *BETA-1,3-GLUCANASE 2 (BGL2)* o *ACD6*. Esto sugiere que el complejo nuclear de LSMs regula negativamente la biosíntesis de SA en condiciones de frío. Además, el complejo controla el *splicing* de *CAMTA3* tras la exposición a 4°C. Se ha descrito que *CAMTA3*, en condiciones estándar, actúa reprimiendo a *SARD* y *CBP60G*, y por tanto la biosíntesis de SA, mientras que la exposición de al menos una semana a temperaturas bajas eliminaría esta represión (Kim y col., 2013b). La supresión de la represión sobre *SARD* y *CBP60G* por parte de *CAMTA3* parece deberse a algún tipo de modificación postranscripcional todavía desconocida (Kim y col., 2013b), aunque es sugerente pensar que el complejo LSM2-LSM8 podría garantizar el *splicing* de su pre-mRNA, impidiendo la síntesis de SA al inicio del proceso de aclimatación. El control de los niveles de SA, sin embargo, podría no estar relacionada con la función del complejo LSM2-LSM8 en dicho proceso. Como se ha comentado en la Introducción (Sección 1.1.1), el papel del SA en la respuesta de aclimatación es controvertido. Mutantes defectivos en *ICS1*, y por tanto en la biosíntesis de SA, no tienen alterada su capacidad de aclimatar a las temperaturas bajas (Kim y col., 2013b). Además, ya hemos mencionado que el complejo controla negativamente la expresión de genes de inducibles por SA en condiciones control,

condiciones en las que los mutantes *lsm8* presentan la misma capacidad de tolerar las temperaturas de congelación que las plantas WT. Por tanto, aunque el complejo nuclear de LSMs podría ejercer de regulador negativo de la señalización por SA, no está claro que esto forme parte de su papel durante el proceso de aclimatación. Sería interesante en trabajos futuros estudiar esta función del complejo para comprender mejor el desarrollo de la respuesta de las plantas a patógenos. Teniendo en cuenta que el complejo parece actuar negativamente sobre los niveles de SA y reprime la expresión de genes de respuesta a patógenos, convendría medir los niveles de SA en los mutantes *lsm8*, así como evaluar su resistencia a la infección por patógenos.

En lo que se refiere a los genes cuya expresión promueve el complejo LSM2-LSM8 en respuesta a las temperaturas bajas, destaca *PP2CA* que en el WT se induce en respuesta a frío, pero actúa como regulador negativo del proceso de aclimatación (Tähtiharju y Palva, 2001). El control de la inducción de *PP2CA* por parte del complejo nuclear de LSMs en condiciones de frío sugiere que también afectaría a la regulación postraduccional de la expresión génica durante la respuesta de aclimatación. Por otro lado, el análisis ontológico de los genes regulados positivamente por el complejo nuclear de LSMs en condiciones de frío muestra un enriquecimiento en genes que codifican proteínas que se localizan en el cloroplasto como, por ejemplo, *LHCB2.4*, *LHCB2.2*, *PNSL2* o *LHCB4.2* que codifican componentes del fotosistema II (Figura 33C). El complejo LSM2-LSM8, por tanto, podría participar en los ajustes de la actividad fotosintética de la planta durante el proceso de aclimatación. Como se ha expuesto, el complejo nuclear de LSMs también asegura el *splicing* de genes cuyos productos se localizan en el cloroplasto, lo que refuerza esta hipótesis. En distintas especies se ha descrito que las temperaturas bajas disminuyen la expresión de genes relacionados con la fotosíntesis (Strand y col., 1997; Wisniewski y col., 2008; Zhang y col., 2009). Esto contribuiría a disminuir la actividad fotosintética como medida para reducir la inhibición por frío de la fotosíntesis causada por el desequilibrio entre la energía convertida por el proceso fotosintético y el descenso en el consumo de productos de la fotosíntesis debido a que la planta reduce su ritmo de crecimiento (Ensminger y col., 2006; Ivanov y col., 2012). Nuestros resultados indican que el complejo LSM2-LSM8 modularía la expresión de genes cuyos productos afectan a la actividad fotosintética para que se produzca una correcta adaptación del cloroplasto durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

La comparación de los genes cuya expresión controlan positiva o negativamente LSM8 y las otras proteínas del espliceosoma RCF1 y STA1 (Ben Chaabane y col., 2013; Guan y col., 2013) en respuesta a temperaturas bajas, muestra un alto número de coincidencias (Figura 34A y B). El solapamiento es alto principalmente entre los genes regulados negativamente, siendo 16 de ellos comunes a las 3 proteínas (Figura 34A). Entre estos 16 genes se encuentran algunos factores de transcripción como *bZIP60*, *WRKY25* y *WRKY33*, lo que sugiere que su inducción, al menos en respuesta a frío, podría estar regulada postranscripcionalmente. Sin embargo, teniendo en cuenta que el complejo LSM2-LSM8

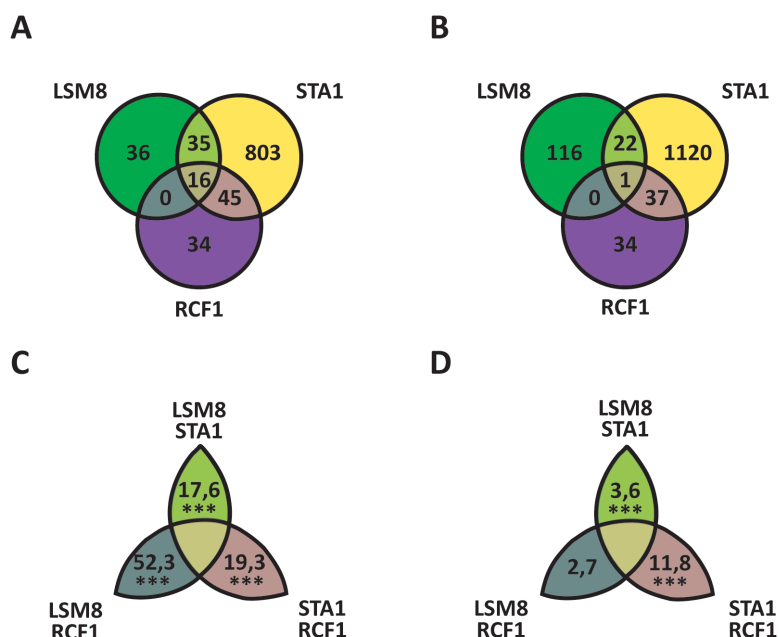


Figura 34. Comparaciones de genes cuya expresión controlan LSM8, RCF1 y STA1 tras la exposición a 4°C.

A y B. Diagrama de Venn con los genes comunes y específicos regulados negativamente (**A**) o positivamente (**B**) por las proteínas LSM8, RCF1 y STA1. **C y D.** Análisis del solapamiento entre los grupos de genes regulados negativamente (**C**) o positivamente (**D**) realizado mediante test hipergeométrico. Los valores mayores o menores de 1 indican que las coincidencias son mayores o menores de lo esperado por azar entre los dos grupos de genes comparados, respectivamente (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$).

regula el proceso de aclimatación negativamente, mientras que RCF1 y STA1 lo hacen positivamente, no parece que estos genes tengan un protagonismo en el papel que estos componentes del espliceosoma juegan en esta respuesta adaptativa. Una gran diferencia entre el complejo LSM2-LSM8, RCF1 y STA1 en respuesta a las temperaturas bajas reside en la regulación de los CBFs. Ninguno de los resultados obtenidos con los mutantes *lsm8* sugiere que el complejo LSM2-LSM8 actúe sobre la ruta de los CBFs. La comparación de los genes diana de los CBFs (Fowler y Thomashow, 2002) con los genes controlados por el complejo nuclear de LSMs revela un único gen coincidente (CORONATINE INDUCED 1). Las proteínas RCF1 y STA1, sin embargo, moderan la inducción de los CBFs y la de sus genes diana, lo que es sorprendente teniendo en cuenta que son reguladores positivos del proceso de aclimatación (Guan y col., 2013). Este es el caso también de BRR2B, otra proteína que forma parte del espliceosoma, que regula positivamente el proceso de aclimatación de *Arabidopsis* y negativamente la expresión de *CBF2* (Guan y col., 2013). Estas diferencias sugieren una alta especificidad por parte de los distintos componentes del espliceosoma en el control de la expresión génica durante el desarrollo del proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. Como ya se ha comentado, también parece existir una alta especificidad en los mRNAs que procesan LSM8, RCF1 y STA1 en respuesta

a 4°C, por lo que este podría ser el origen de las diferencias observadas a nivel de la expresión génica. Al igual que en los casos anteriores, no se puede descartar que parte de estas diferencias sean debidas a las distintas condiciones experimentales empleadas en cada trabajo.

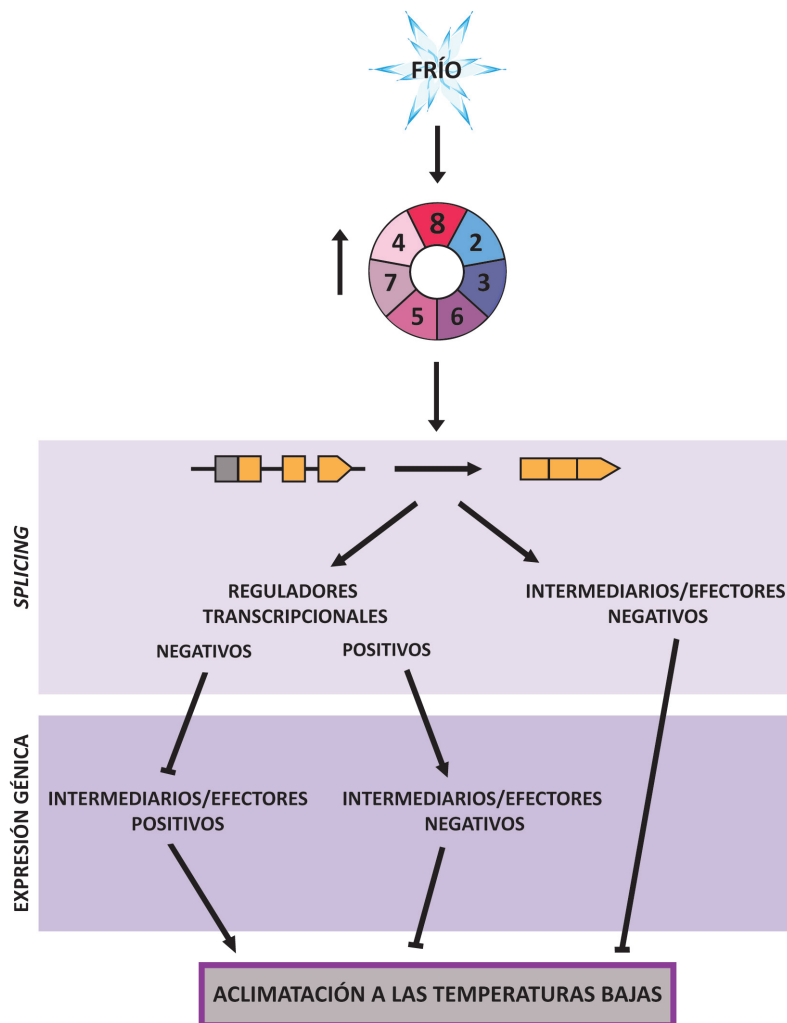


Figura 35. Modelo de actuación propuesto para el complejo LSM2-LSM8 en la regulación de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

En respuesta a las temperaturas bajas, el complejo LSM2-LSM8 aumenta sus niveles para asegurar el correcto *splicing* de genes involucrados en el proceso de aclimatación. Entre ellos se encuentran genes que codifican reguladores transcripcionales o proteínas (intermediarios/effectores) cuya actividad puede afectar al desarrollo de esta respuesta adaptativa. Los reguladores transcripcionales correctamente procesados controlarían la expresión de genes que codifican proteínas (intermediarios/effectores) que regularían positiva o negativamente el proceso de aclimatación. Las líneas acabadas en flecha o en líneas transversales indican regulación positiva o negativa, respectivamente.

Nuestros resultados demuestran la importancia del procesamiento de los pre-mRNAs, en concreto de su *splicing*, para que se produzca una correcta expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas. En este contexto, el complejo LSM2-LSM8 aumenta tras la exposición a frío para asegurar el *splicing* de numerosos genes, dando lugar a una precisa remodelación de la expresión génica que resultará en los cambios fisiológicos que permiten el aumento de la tolerancia a la congelación. El proceso de aclimatación, como ya se mencionó en la Introducción, es muy complejo y en él intervienen multitud de factores y niveles de regulación. Pese a esta complejidad, hemos podido discernir algunos de los procesos moleculares a los que afecta el complejo nuclear de LSMs y que podrían influir en el desarrollo idóneo de esta respuesta adaptativa (Figura 35). El complejo LSM2-LSM8 garantiza el *splicing* de genes que codifican reguladores transcripcionales, pero también participa en la modulación de la inducción de numerosos factores de transcripción. Además, el complejo nuclear de LSMs contribuye en la moderación de los cambios que tienen lugar en el cloroplasto y la mitocondria durante el proceso de aclimatación. El complejo controla el *splicing* de genes que codifican componentes del cloroplasto y regula la expresión de genes que codifican componentes del cloroplasto y de la mitocondria, estos últimos pertenecientes, en su mayoría, a los regulados por la respuesta retrograda de este orgánulo. Por tanto, en este trabajo hemos desvelado un nuevo mecanismo de control postranscripcional de la expresión génica durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas que se une a los descritos recientemente para RCF1, STA1 y BRR2B (Ben Chaabane y col., 2013; Guan y col., 2013). Más aún, la comparación de nuestros resultados con los obtenidos en la caracterización de estas proteínas nos ha permitido observar que, pese a que todas ellas forman parte del mismo macrocomplejo, el espliceosoma, cada una de ellas tiene una función diferente durante el desarrollo de la respuesta adaptativa. Mientras que el complejo LSM2-LSM8 regula el proceso de aclimatación negativamente, RCF1, STA1 y BRR2B lo hacen positivamente, y, consecuentemente, controlan el *splicing* y la expresión de diferentes grupos de genes. Estudios más detallados permitirán, en un futuro, descifrar las características que confieren la especificidad a los transcritos que procesa el complejo nuclear de LSMs durante el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas.

5. CONCLUSIONES

1. En *Arabidopsis thaliana* existen las proteínas LSMs necesarias para la formación de los complejos de LSMs descritos en humanos y levaduras.
2. La proteína LSM8 es esencial para la formación del complejo nuclear de LSMs en *Arabidopsis*.
3. El complejo nuclear LSM2-LSM8 en *Arabidopsis* estabiliza específicamente el U6 snRNA y participa en el *splicing* de pre-mRNAs.
4. El complejo nuclear LSM2-LSM8 controla el correcto desarrollo de *Arabidopsis* asegurando el *splicing* y/o la expresión de genes implicados en el mismo.
5. El complejo nuclear LSM2-LSM8 regula negativamente el proceso de aclimatación a las temperaturas bajas en *Arabidopsis* controlando el *splicing* y/o la expresión de un alto número de genes inducibles por frío, incluyendo numerosos factores de transcripción, genes de respuesta a estrés de la mitocondria y genes relacionados con la fotosíntesis.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Abler, M. L. y Green, P. J.** (1996). Control of mRNA stability in higher plants. *Plant Molecular Biology*. **32**: 63-78
- Achard, P., Gong, F., Cheminant, S., Alioua, M., Hedden, P. y Genschik, P.** (2008). The cold-inducible CBF1 factor-dependent signaling pathway modulates the accumulation of the growth-repressing DELLA proteins via its effect on gibberellin metabolism. *The Plant Cell*. **20**: 2117-2129
- Achsel, T., Brahms, H., Kastner, B., Bachi, A., Wilm, M. y Lührmann, R.** (1999). A doughnut-shaped heteromer of human Sm-like proteins binds to the 3'-end of U6 snRNA, thereby facilitating U4/U6 duplex formation in vitro. *The EMBO Journal*. **18**: 5789-5802
- Agarwal, M., Hao, Y., Kapoor, A., Dong, C.-H., Fujii, H., Zheng, X. y Zhu, J.-K.** (2006). A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance. *The Journal of Biological Chemistry*. **281**: 37636-37645
- Airaki, M., Leterrier, M., Mateos, R. M., Valderrama, R., Chaki, M., Barroso, J. B., Del Rio, L. A., Palma, J. M. y Corpas, F. J.** (2012). Metabolism of reactive oxygen species and reactive nitrogen species in pepper (*Capsicum annuum* L.) plants under low temperature stress. *Plant Cell and Environment*. **35**: 281-295
- Aki, S., Nakai, H., Aoyama, T., Oka, A. y Tsuge, T.** (2011). AtSAP130/AtSF3b-3 function is required for reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*. **52**: 1330-1339
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. y Lipman, D. J.** (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*. **215**: 403-410
- Anantharaman, V., Koonin, E. V. y Aravind, L.** (2002). Comparative genomics and evolution of proteins involved in RNA metabolism. *Nucleic Acids Research*. **30**: 1427-1464
- Baker, S. S., Wilhelm, K. S. y Thomashow, M. F.** (1994). The 5'-region of *Arabidopsis thaliana cor15a* has *cis*-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression. *Plant Molecular Biology*. **24**: 701-713
- Barrero-Gil, J. y Salinas, J.** (2013). Post-translational regulation of cold acclimation response. *Plant Science*. **205**: 48-54
- Beggs, J. D.** (2005). Lsm proteins and RNA processing. *Biochemical Society Transactions*. **33**: 433-438
- Ben Chaabane, S., Liu, R., Chinnusamy, V., Kwon, Y., Park, J.-h., Kim, S. Y., Zhu, J.-K., Yang, S. W. y Lee, B.-H.** (2013). STA1, an *Arabidopsis* pre-mRNA processing factor 6 homolog, is a new player involved in miRNA biogenesis. *Nucleic Acids Research*. **41**: 1984-1997
- Berardini, T. Z., Mundodi, S., Reiser, R., Huala, E., García-Hernández, M., Zhang, P., Mueller, L. M., Yoon, J., Doyle, A., Lander, G., Moseyko, N., Yoo, D., Xu, I., Zoeckler, B., Montoya, M., Miller, N., Weems, D. y Rhee, S. Y.** (2004). Functional annotation of the *Arabidopsis* genome using controlled vocabularies. *Plant Physiology*. **135**: 1-11

- Berberich, T. y Kusano, T.** (1997). Cycloheximide induces a subset of low temperature-inducible genes in maize. *Molecular and General Genetics*. **254**: 275-283
- Birnboim, H. C. y Doly, J.** (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*. **7**: 1513-1523
- Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M. y Séraphin, B.** (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *The EMBO Journal*. **19**: 1661-1671
- Brenner, W. G., Romanov, G. A., Köllmer, I., Bürkle, L. y Schmölling, T.** (2005). Immediate-early and delayed cytokinin response genes of *Arabidopsis thaliana* identified by genome-wide expression profiling reveal novel cytokinin-sensitive processes and suggest cytokinin action through transcriptional cascades. *The Plant Journal*. **44**: 314-333
- Bringmann, P. y Lührmann, R.** (1986). Purification of the individual snRNPs U1, U2, U5 and U4/U6 from HeLa cells and characterization of their protein constituents. *The EMBO Journal*. **5**: 3509-3516
- Brown, D. M., Zhang, Z., Stephens, E., Dupree, P. y Turner, S. R.** (2009). Characterization of IRX10 and IRX10-like reveals an essential role in glucuronoxylan biosynthesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **57**: 732-746
- Cao, S., Ye, M. y Jiang, S.** (2005). Involvement of GIGANTEA gene in the regulation of the cold stress response in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*. **24**: 683-690
- Capron, A., Chatfield, S., Provart, N. y Berleth, T.** (2009). Embryogenesis: Pattern Formation from a Single Cell. *The Arabidopsis Book*. **7**: e0126
- Casson, S. A., Topping, J. F. y Lindsey, K.** (2009). MERISTEM-DEFECTIVE, an RS domain protein, is required for the correct meristem patterning and function in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **57**: 857-869
- Castillejo, C. y Pelaz, S.** (2008). The balance between CONSTANS and TEMPRANILLO activities determines FT expression to trigger flowering. *Current Biology*. **18**: 1338-1343
- Catalá, R., Medina, J. y Salinas, J.** (2011). Integration of low temperature and light signaling during cold acclimation response in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **108**: 16475-16480
- Catalá, R., Santos, E., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Martínez-Zapater, J. M. y Salinas, J.** (2003). Mutations in the Ca²⁺/H⁺ transporter CAX1 increase *CBF/DREB1* expression and the cold-acclimation response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **15**: 2940-2951
- Catalá, R., López-Cobollo, R., Castellano, M. M., Angosto, T., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Salinas, J.** (2014). The *Arabidopsis* 14-3-3 protein RARE COLD INDUCIBLE 1A links low-temperature response and ethylene biosynthesis to regulate freezing tolerance and cold acclimation. *The Plant Cell*. **26**: 3326-3342

- Cenis, J. L.** (1992). Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. *Nucleic Acids Research*. **20**: 2380
- Chen, H. H., Li, P. H. y Brenner, M. L.** (1983). Involvement of abscisic acid in potato cold acclimation. *Plant Physiology*. **71**: 362-365
- Cheng, N. H., Pittman, J. K., Barkla, B. J., Shigaki, T. y Hirschi, K. D.** (2003). The *Arabidopsis* *cax1* mutant exhibits impaired ion homeostasis, development, and hormonal responses and reveals interplay among vacuolar transporters. *The Plant Cell*. **15**: 347-364
- Cheong, Y. H., Kim, K. N., Pandey, G. K., Gupta, R., Grant, J. J. y Luan, S.** (2003). CBL1, a calcium sensor that differentially regulates salt, drought, and cold responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **15**: 1833-1845
- Chiba, Y., Mineta, K., Hirai, M. Y., Suzuki, Y., Kanaya, S., Takahashi, H., Onouchi, H., Yamaguchi, J. y Naito, S.** (2013). Changes in mRNA stability associated with cold stress in *Arabidopsis* cells. *Plant and Cell Physiology*. **54**: 180-194
- Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B.-h., Hong, X., Agarwal, M. y Zhu, J.-K.** (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes and Development*. **17**: 1043-1054
- Choi, H.-I., Hong, J.-H., Ha, J.-O., Kang, J.-Y. y Kim, S. Y.** (2000). ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors. *The Journal of Biological Chemistry*. **275**: 1723-1730
- Chung, T., Wang, D., Kim, C. S., Yadegari, R. y Larkins, B. A.** (2009). Plant SMU-1 and SMU-2 homologues regulate pre-mRNA splicing and multiple aspects of development. *Plant Physiology*. **151**: 1498-1512
- Ciardi, J. A., Deikman, J. y Orzolek, M. D.** (1997). Increased ethylene synthesis enhances chilling tolerance in tomato. *Physiologia Plantarum*. **101**: 333-340
- Clercq, I. D., Vermeirssen, V., Aken, O. V., Vandepoele, K., Murcha, M. W., Law, S. R., Inzé, A., Ng, S., Ivanova, A., Rombaut, D., Cotte, B. v. d., Jaspers, P., Peer, Y. V. d., Kangasjärvi, J., Whelan, J. y Breusegema, F. V.** (2013). The membrane-bound NAC transcription factor ANAC013 functions in mitochondrial retrograde regulation of the oxidative stress response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **25**: 3472-3490
- Clough, S. J. y Bent, A. F.** (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **16**: 735-743
- Coates, J. C., Laplaze, L. y Haseloff, J.** (2006). Armadillo-related proteins promote lateral root development in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**: 1621-1626
- Cooper, M., Johnston, L. H. y Beggs, J. D.** (1995). Identification and characterization of Uss1p (Sdb23p): a novel U6 snRNA-associated protein with significant similarity to core proteins of small nuclear ribonucleoproteins. *The EMBO Journal*. **14**: 2066-2075

- Corpas, F. J., Chaki, M., Fernández-Ocaña, A., Valderrama, R., Palma, J. M., Carreras, A., Begara-Morales, J. C., Airaki, M., del Río, L. A. y Barroso, J. B. (2008). Metabolism of reactive nitrogen species in pea plants under abiotic stress conditions. *Plant and Cell Physiology*. **49**: 1711-1722
- Courty, D. A., Zhang, C., Ko, A., Skaggs, M. I., Christensen, C. A., Drews, G. N., Feldmann, K. A. y Yadegari, R. (2007). Segregation distortion in *Arabidopsis* gametophytic factor 1 (*gfa1*) mutants is caused by a deficiency of an essential RNA splicing factor. *Sexual Plant Reproduction*. **20**: 87-97
- Cuevas, J. C., López-Cobollo, R., Alcazar, R., Zarza, X., Koncz, C., Altabella, T., Salinas, J., Tiburcio, A. F. y Ferrando, A. (2008). Putrescine is involved in *Arabidopsis* freezing tolerance and cold acclimation by regulating abscisic acid levels in response to low temperature. *Plant Physiology*. **148**: 1094-1105
- Cui, P., Zhang, S., Ding, F., Ali, S. y Xiong, L. (2014). Dynamic regulation of genome-wide pre-mRNA splicing and stress tolerance by the Sm-like protein LSm5 in *Arabidopsis*. *Genome Biology*. **15**: R1
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K. y Scheible, W. R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **139**: 5-17
- Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M. y Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*. **13**: 4777-4788
- Degenkolbe, T., Giavalisco, P., Zuther, E., Seiwert, B., Hinch, D. K. y Willmitzer, L. (2012). Differential remodeling of the lipidome during cold acclimation in natural accessions of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **72**: 972-982
- Divi, U. K. y Krishna, P. (2010). Overexpression of the brassinosteroid biosynthetic gene *AtDWF4* in *Arabidopsis* seeds overcomes abscisic acid-induced inhibition of germination and increases cold tolerance in transgenic seedlings. *Journal of Plant Growth Regulation*. **29**: 385-393
- Doherty, C. J., Van Buskirk, H. A., Myers, S. J. y Thomashow, M. F. (2009). Roles for *Arabidopsis* CAMTA transcription factors in cold-regulated gene expression and freezing tolerance. *The Plant Cell*. **21**: 972-984
- Dong, C.-H., Hu, X., Tang, W., Zheng, X., Kim, Y. S., Lee, B. H. y Zhu, J.-K. (2006a). A putative *Arabidopsis* nucleoporin, AtNUP160, is critical for RNA export and required for plant tolerance to cold stress. *Molecular and Cellular Biology*. **26**: 9533-9543
- Dong, C. H., Agarwal, M., Zhang, Y., Xie, Q. y Zhu, J. -K. (2006b). The negative regulator of plant cold responses, HOS1, is a RING E3 ligase that mediates the ubiquitination and degradation of ICE1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**: 8281-8286
- Dong, M. A., Farré, E. M. y Thomashow, M. F. (2011). CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED 1 and LATE ELONGATED HYPOCOTYL regulate expression of the C-REPEAT BINDING FACTOR

(CBF) pathway in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **108**: 7241-7246

Dunn, M. A., Goddard, N. J., Zhang, L., Pearce, R. S. y Hughes, M. A. (1994). Low-temperature-responsive barley genes have different control mechanisms. *Plant Molecular Biology* **24**: 879-888

Echevarría-Zomeño, S., Yánguez, E., Fernández-Bautista, N., Castro-Sanz, A. B., Ferrando, A. y Castellano, M. M. (2013). Regulation of translation initiation under biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. **14**: 4670-4683

English, J., Davenport, G., Elmayan, T., Vaucheret, H. y Baulcombe, D. (1997). Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *The Plant Journal*. **12**: 597-603

Ensminger, I., Busch, F. y Hüner, N. P. A. (2006). Photostasis and cold acclimation: sensing low temperature through photosynthesis. *Physiologia Plantarum*. **126**: 28-44

Filichkin, S. A., Priest, H. D., Givan, S. A., Shen, R., Bryant, D. W., Fox, S. E., Wong, W.-K. y Mockler, T. C. (2009). Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Research*. **20**: 15-58

Fiorani, F., Umbach, A. L. y Siedow, J. N. (2005). The alternative oxidase of plant mitochondria is involved in the acclimation of shoot growth at low temperature. A study of *Arabidopsis* AOX1a transgenic plants. *Plant Physiology*. **139**: 1795-1805

Fowler, S. y Thomashow, M. F. (2002). *Arabidopsis* transcriptome profiling indicates that multiple regulatory pathways are activated during cold acclimation in addition to the CBF cold response pathway. *The Plant Cell*. **14**: 1675-1690.

Fowler, S. G., Cook, D. y Thomashow, M. F. (2005). Low temperature induction of *Arabidopsis* CBF1, 2, and 3 is gated by the circadian clock. *Plant Physiology*. **137**: 961-968

Fujikura, U., Horiguchi, G., Ponce, M. R., Micol, J. L. y Tsukaya, H. (2009). Coordination of cell proliferation and cell expansion mediated by ribosome-related processes in the leaves of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **59**: 499-508

Fursova, O. V., Pogorelko, G. V. y Tarasov, V. A. (2009). Identification of ICE2, a gene involved in cold acclimation which determines freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*. **429**: 98-103

Gilmour, S. J. y Thomashow, M. F. (1991). Cold acclimation and cold-regulated gene expression in ABA mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **17**: 1233-1240

Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Stockinger, E. J., Salazar, M. P., Houghton, J. M. y Thomashow, M. F. (1998). Low temperature regulation of the *Arabidopsis* CBF family of AP2 transcriptional activators as an early step in cold-induced COR gene expression. *The Plant Journal*. **16**: 433-442

Goeres, D. C., Van Norman, J. M., Zhang, W., Fauver, N. A., Spencer, M. L. y Sieburth, L. E. (2007). Components of the *Arabidopsis* mRNA decapping complex are required for early seedling

development. *The Plant Cell*. **19**: 1549-1564

Golis, A., Sikorski, P. J., Kruszka, K. y Kufel, J. (2013). *Arabidopsis thaliana* LSM proteins function in mRNA splicing and degradation. *Nucleic Acids Research*. **41**: 6232-6249

Golovkin, M. y Reddy, A. S. N. (2003). Expression of U1 small nuclear ribonucleoprotein 70K antisense transcript using APETALA3 promoter suppresses the development of sepals and petals. *Plant Physiology*. **132**: 1884-1891

Gong, Z., Lee, H., Xiong, L., Jagendorf, A., Stevenson, B. y Zhu, J. -K. (2002). RNA helicase-like protein as an early regulator of transcription factors for plant chilling and freezing tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 11507-11512

Gong, Z., Dong, C.-H., Lee, H., Zhu, J., Xiong, L., Gong, D., Stevenson, B. y Zhu, J.-K. (2005). A DEAD Box RNA helicase is essential for mRNA export and important for development and stress responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **17**: 256-267

Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N. y Rokhsar, D. S. (2012). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Research*. **40**: 1178-1186

Groß-Hardt, R., Kägi, C., Baumann, N., Moore, J. M., Baskar, R., Gagliano, W. B., Jürgens, G. y Grossniklaus, U. (2007). LACHESIS Restricts Gametic Cell Fate in the Female Gametophyte of *Arabidopsis*. *PLoS Biology*. **5**: e47

Guan, Q., Wu, J., Zhang, Y., Jiang, C., Liu, R., Chai, C. y Zhu, J. (2013). A DEAD Box RNA helicase is critical for pre-mRNA splicing, cold-responsive gene regulation, and cold tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **25**: 342-356

Guiltinan, M. J., Marcotte, W. R. J. y Quatrano, R. S. (1990). A plant Leucine zipper protein that recognizes an abscisic acid response element. *Science*. **250**: 267-271

Guo, Y., Xiong, L., Ishitani, M. y Zhu, J.-K. (2002). An *Arabidopsis* mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of *CBF/DREB1* transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 7786-7791

Gutiérrez, R. A., Ewing, R. M., Cherry, J. M. y Green, P. J. (2002). Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: Rapid decay is associated with a group of touch and specific clock-controlled genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 11513-11518

Hajela, R. K., Horvath, D. P., Gilmour, S. J. y Thomashow, M. F. (1990). Molecular cloning and expression of *cor* (*Cold-Regulated*) genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. **93**: 1246-1252

Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/Nt. *Nucleic Acids Symposium Series*. **41**: 95-98

- Heil, M. y Baldwin, I. T.** (2002). Fitness costs of induced resistance: emerging experimental support for a slippery concept. *Trends in Plant Science*. **7**: 61-67
- Hepler, P. K. y Hush, J. M.** (1996). Behavior of microtubules in living plant cells. *Plant Physiology*. **112**: 455-461
- Hermann, H., Fabrizio, P., Raker, V. a., Foulaki, K., Hornig, H., Brahms, H. y Lührmann, R.** (1995). SnRNP Sm proteins share two evolutionarily conserved sequence motifs which are involved in Sm protein-protein interactions. *The EMBO Journal*. **14**: 2076-2088
- Herr, A. J., Molnár, A., Jones, A. y Baulcombe, D. C.** (2006). Defective RNA processing enhances RNA silencing and influences flowering of Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**: 14994-15001
- Hinterberger, M., Pettersson, I. y Steitz, J. A.** (1983). Isolation of small nuclear ribonucleoproteins containing U1, U2, U4, U5, and U6 RNAs. *Journal of Biological Chemistry*. **258**: 2604-2613
- Hirsch, E., Oohashi, T., Ahmad, M., Stamm, S. y Fässler, R.** (2000). Peri-implantation lethality in mice lacking the Sm motif-containing protein Lsm4. *Molecular and Cellular Biology*. **20**: 1055-1062
- Hirschi, K. D.** (1999). Expression of Arabidopsis *CAX1* in tobacco: altered calcium homeostasis and increased stress sensitivity. *The Plant Cell*. **11**: 2113-2122
- Hirschi, K. D., Zhen, R. G., Cunningham, K. W., Rea, P. A. y Fink, G. R.** (1996). *CAX1*, an H⁺/Ca²⁺ antiporter from Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**: 8782-8786
- Hu, Y., Jiang, L., Wang, F. y Yu, D.** (2013). Jasmonate regulates the INDUCER OF CBF EXPRESSION-C-REPEAT BINDING FACTOR/DRE BINDING FACTOR1 cascade and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **28**: 2907-2924
- Huang, C. F., Miki, D., Tang, K., Zhou, H.-R., Zheng, Z., Chen, W., Ma, Z.-Y., Yang, L., Zhang, H., Liu, R., He, X.-J. y Zhu, J.-K.** (2013). A pre-mRNA splicing factor is required for RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *PLOS Genetics*. **9**: e1003779
- Huang, G. T., Ma, S. L., Bai, L. P., Zhang, L., Ma, H., Jia, P., Liu, J., Zhong, M. y Guo, Z. F.** (2012). Signal transduction during cold, salt, and drought stresses in plants. *Molecular Biology Reports*. **39**: 969-987
- Iida, K., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Toyoda, T., Konagaya, A. y Shinozaki, K.** (2004). Genome-wide analysis of alternative pre-mRNA splicing in *Arabidopsis thaliana* based on full-length cDNA sequences. *Nucleic Acids Research*. **32**: 5096-5103
- Iliev, E. A., Xu, W., Polisensky, D. H., Oh, M. H., Torisky, R. S., Clouse, S. D. y Braam, J.** (2002). Transcriptional and posttranscriptional regulation of Arabidopsis *TCH4* expression by diverse stimuli. Roles of *cis* regions and brassinosteroids. *Plant Physiology*. **130**: 770-783

- Inaba, T., Álvarez-Huerta, M., Li, M., Bauer, J., Ewers, C., Kessler, F. y Schnell, D. J.** (2005). *Arabidopsis* Tic110 is essential for the assembly and function of the protein import machinery of plastids. *The Plant Cell*. **17**: 1482-1496
- Iordachescu, M. y Imai, R.** (2008). Trehalose biosynthesis in response to abiotic stresses. *Journal of Integrative Plant Biology*. **50**: 1223-1229
- Ishitani, M., Xiong, L., Lee, H., Stevenson, B. y Zhu, J. -K.** (1998). HOS1, a genetic locus involved in cold-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **10**: 1151-1161
- Ivanov, A. G., Rosso, D., Savitch, L. V., Stachula, P., Rosembert, M., Oquist, G., Hurry, V. y Hüner, N. P. A.** (2012). Implications of alternative electron sinks in increased resistance of PSII and PSI photochemistry to high light stress in cold-acclimated *Arabidopsis thaliana*. *Photosynthesis Research*. **113**: 191-206
- Iwata, Y., Fedoroff, N. V. y Koizumi, N.** (2008). *Arabidopsis* bZIP60 is a proteolysis-activated transcription factor involved in the endoplasmic reticulum stress response. *The Plant Cell*. **20**: 3107-3121
- Jaglo-Ottosen, K. R., Gilmour, S. J., Zarka, D. G., Schabenberger, O. y Thomashow, M. F.** (1998). *Arabidopsis* *CBF1* overexpression induces *COR* genes and enhances freezing tolerance. *Science*. **280**: 104-106
- Jang, Y. H., Park, H. Y., Lee, K. C., Thu, M. P., Kim, S. K., Suh, M. C., Kang, H. y Kim, J. K.** (2014). A homolog of splicing factor SF1 is essential for development and is involved in the alternative splicing of pre-mRNA in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **78**: 591-603
- Jarillo, J. A., Capel, J., Leyva, A., Martínez-Zapater, J. M. y Salinas, J.** (1994). Two related low-temperature-inducible genes of *Arabidopsis* encode proteins showing high homology to 14-3-3 proteins, a family of putative kinase regulators. *Plant Molecular Biology*. **25**: 693-704
- Jeon, J., Kim, N. Y., Kim, S., Kang, N. Y., Novak, O., Ku, S. J., Cho, C., Lee, D. J., Lee, E. J., Strnad, M. y Kim, J.** (2012). A subset of cytokinin two-component signaling system plays a role in cold temperature stress response in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**: 23371-23386
- Jiang, C., Iu, B. y Singh, J.** (1996). Requirement of a CCGAC *cis*-acting element for cold induction of the *BN115* gene from winter *Brassica napus*. *Plant Molecular Biology*. **30**: 679-684
- Jiang, J., Wang, B., Shen, Y., Wang, H., Feng, Q. y Shi, H.** (2013). The *Arabidopsis* RNA binding protein with K homology motifs, SHINY1, interacts with the C-terminal Domain Phosphatase-like 1 (CPL1) to repress stress-inducible gene expression. *PLoS Genetics*. **9**: e1003625
- Jiang, Y. y Deyholos, M. K.** (2009). Functional characterization of *Arabidopsis* NaCl-inducible WRKY25 and WRKY33 transcription factors in abiotic stresses. *Plant Molecular Biology*. **69**: 91-105
- Juntawong, P., Sorenson, R. y Bailey-Serres, J.** (2013). Cold shock protein 1 chaperones mRNAs

during translation in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. **74**: 1016-1028

Kagale, S., Divi, U. K., Krochko, J. E., Keller, W. A. y Krishna, P. (2007). Brassinosteroid confers tolerance in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* to a range of abiotic stresses. Planta. **225**: 353-364

Kambach, C., Walke, S., Young, R., Avis, J. M., de la Fortelle, E., Raker, V. a., Lührmann, R., Li, J. y Nagai, K. (1999). Crystal structures of two Sm protein complexes and their implications for the assembly of the spliceosomal snRNPs. Cell. **96**: 375-387

Kariola, T., Brader, G., Li, J. y Palva, E. T. (2005). Chlorophyllase 1, a damage control enzyme, affects the balance between defense pathways in plants. The Plant Cell. **17**: 282-294

Kasuga, M., Liu, Q., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. Nature Biotechnology. **17**: 287-291

Katoh, K. y Toh, H. (2008). Recent developments in the MAFFT multiple sequence alignment program. Briefings in Bioinformatics. **9**: 286-298

Kauschmann, A., Jessop, A., Koncz, C., Szekeres, M., Willmitzer, L. y Altmann, T. (1996). Genetic evidence for an essential role of brassinosteroids in plant development. The Plant Journal. **9**: 701-713

Khusial, P., Plaag, R. y Zieve, G. W. (2005). LSM proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs. Trends in Biochemical Sciences. **30**: 522-528

Kim, J. C., Lee, S. H., Cheong, Y. H., Yoo, C. M., Lee, S. I., Chun, H. J., Yun, D. J., Hong, J. C., Lee, S. Y., Lim, C. O. y Cho, M. J. (2001). A novel cold-inducible zinc finger protein from soybean, SCOF-1, enhances cold tolerance in transgenic plants. The Plant Journal. **25**: 247-259

Kim, J. O., Kim, J. S. y Kang, H. (2005). Cold-inducible zinc finger-containing glycine-rich RNA-binding protein contributes to the enhancement of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. **42**: 890-900

Kim, J. S., Park, S. J., Kwak, K. J., Kim, Y. O., Kim, J. Y., Song, J., Jang, B., Jung, C.-H. y Kang, H. (2007a). Cold shock domain proteins and glycine-rich RNA-binding proteins from *Arabidopsis thaliana* can promote the cold adaptation process in *Escherichia coli*. Nucleic Acids Research. **35**: 506-516

Kim, J. S., Jung, H. J., Lee, H. J., Kim, K. A., Goh, C. H., Woo, Y., Oh, S. H., Han, Y. S. y Kang, H. (2008). Glycine-rich RNA-binding protein 7 affects abiotic stress responses by regulating stomata opening and closing in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. **55**: 455-466

Kim, J. Y., Park, S. J., Jang, B., Jung, C., Ahn, S. J., Goh, C., Cho, K., Han, O. y Kang, H. (2007b). Functional characterization of a glycine-rich RNA-binding protein 2 in *Arabidopsis thaliana* under abiotic stress conditions. The Plant Journal. **50**: 439-451

- Kim, K. N., Cheong, Y. H., Grant, J. J., Pandey, G. K. y Luan, S.** (2003). CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **15**: 411-423
- Kim, M.-H., Sonoda, Y., Sasaki, K., Kaminaka, H. y Imai, R.** (2013a). Interactome analysis reveals versatile functions of *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 3 in RNA processing within the nucleus and cytoplasm. *Cell Stress and Chaperones*. **18**: 517-525
- Kim, M. H., Sasaki, K. y Imai, R.** (2009). Cold shock domain protein 3 regulates freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*. **284**: 23454-23460
- Kim, S. Y., Zhu, T. y Sung, Z. R.** (2010). Epigenetic regulation of gene programs by EMF1 and EMF2 in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **152**: 516-528
- Kim, Y. S., Park, S., Gilmour, S. J. y Thomashow, M. F.** (2013b). Roles of CAMTA transcription factors and salicylic acid in configuring the low-temperature transcriptome and freezing tolerance of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. **75**: 364-376
- Kiss, T.** (2004). Biogenesis of small nuclear RNPs. *Journal of Cell Science*. **117**: 5949-5951
- Knaupp, M., Mishra, K., Nedbal, L. y Heyer, A.** (2011). Evidence for a role of raffinose in stabilizing photosystem II during freeze-thaw cycles. *Planta*. **234**: 477-486
- Knight, H., Trewavas, A. J. y Knight, M. R.** (1996). Cold calcium signaling in *Arabidopsis* involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell*. **8**: 489-503
- Knight, M. R. y Knight, H.** (2012). Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist*. **195**: 737-751
- Knight, M. R., Campbell, A. K., Smith, S. M. y Trewavas, A. J.** (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature*. **352**: 524-526
- Koiwa, H., Hausmann, S., Bang, W. Y., Ueda, A., Kondo, N., Hiraguri, A., Fukuhara, T., Bahk, J. D., Yun, D.-J., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. y Shuman, S.** (2004). *Arabidopsis* C-terminal domain phosphatase-like 1 and 2 are essential Ser-5-specific C-terminal domain phosphatases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**: 14539-14544
- Koiwa, H., Barb, A. W., Xiong, L., Li, F., McCully, M. G., Lee, B.-h., Sokolchik, I., Zhu, J., Gong, Z., Reddy, M., Sharkhuu, A., Manabe, Y., Yokoi, S., Zhu, J. K., Bressan, R. A. y Hasegawa, P. M.** (2002). C-terminal domain phosphatase-like family members (AtCPLs) differentially regulate *Arabidopsis thaliana* abiotic stress signalling, growth, and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 10893-10898
- Koncz, C., deJong, F., Villacorta, N., Szakonyi, D. y Koncz, Z.** (2012). The spliceosome-activating complex: molecular mechanisms underlying the function of a pleiotropic regulator. *Frontiers in Plant Science*. **3**: 9

- Koster, K. L. y Lynch, D. V.** (1992). Solute accumulation and compartmentation during the cold acclimation of puma rye. *Plant Physiology*. **98**: 108-113
- Kovacs, Z., Simon-Sarkadi, L., Szucs, A. y Kocsy, G.** (2010). Differential effects of cold, osmotic stress and abscisic acid on polyamine accumulation in wheat. *Amino Acids*. **38**: 623-631
- Krizek, B. A.** (2011). Aintegumenta and Aintegumenta-like 6 regulate auxin-mediated flower development in *Arabidopsis*. *BMC Research Notes*. **4**: 1-8
- Kurkela, S. y Borg-Franck, M.** (1992). Structure and expression of *kin2*, one of two cold- and ABA-induced genes of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology* **19**: 689-692
- Lageix, S., Lanet, E., Pouch-Pelissier, M. N., Espagnol, M. C., Robaglia, C., Deragon, J. M. y Pelissier, T.** (2008). *Arabidopsis* eIF2a kinase GCN2 is essential for growth in stress conditions and is activated by wounding. *BMC Plant Biology*. **8**: 134
- Lamesch, P., Berardini, T. Z., Li, D., Swarbreck, D., Wilks, C., Sasidharan, R., Muller, R., Dreher, K., Alexander, D. L., García-Hernández, M., Karthikeyan, A. S., Lee, C. H., Nelson, W. D., Ploetz, L., Singh, S., Wensel, A. y Huala, E.** (2012). The *Arabidopsis* Information Resource (TAIR): improved gene annotation and new tools. *Nucleic Acids Research*. **40**: D1202-D1210
- Lang, V., Mantyla, E., Welin, B., Sundberg, B. y Palva, E. T.** (1994). Alterations in water status, endogenous abscisic acid content, and expression of *rab18* gene during the development of freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. **104**: 1341-1349
- Laubinger, S., Sachsenberg, T., Zeller, G., Busch, W., Lohmann, J. U., Ratsch, G. y Weigel, D.** (2008a). Dual roles of the nuclear cap-binding complex and SERRATE in pre-mRNA splicing and microRNA processing in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **105**: 8795-8800
- Laubinger, S., Zeller, G., Henz, S. R., Sachsenberg, T., Widmer, C. K., Naouar, N., Vuylsteke, M., Scholkopf, B., Ratsch, G. y Weigel, D.** (2008b). At-TAX: a whole genome tiling array resource for developmental expression analysis and transcript identification in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*. **9**: R112
- Lee, B. H., Henderson, D. A. y Zhu, J. -K.** (2005). The *Arabidopsis* cold-responsive transcriptome and its regulation by ICE1. *The Plant Cell*. **17**: 3155-3175
- Lee, B. H., Kapoor, A., Zhu, J. y Zhu, J. -K.** (2006). STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **18**: 1736-1749
- Lee, C. M. y Thomashow, M. F.** (2012). Photoperiodic regulation of the C-repeat binding factor (CBF) cold acclimation pathway and freezing tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**: 15054-15059
- Lee, T.-M., Lur, H.-S. y Chu, C.** (1995). Abscisic acid and putrescine accumulation in chilling-tolerant rice cultivars. *Crop Science*. **35**: 502-508

- Lee, Y., Choi, D. y Kende, H.** (2001). Expansins: ever-expanding numbers and functions. *Current Opinion in Plant Biology*. **4**: 527-532
- Lerner, M. R. y Boyle, J. A.** (1981). Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with Lupus Erythematosus. *Science*. **211**: 400-402
- Leviatan, N., Alkan, N., Leshkowitz, D. y Fluhr, R.** (2013). Genome-wide survey of cold stress regulated alternative splicing in *Arabidopsis thaliana* with tiling microarray. *PLoS ONE*. **8**: e66511
- Levitt, J.** (1980). Chilling, freezing, and high temperature stresses. In *Responses of Plant to Environmental Stresses*. Academic Press, pp. 497
- Li, S., Fu, Q., Chen, L., Huang, W. y Yu, D.** (2011). *Arabidopsis thaliana* WRKY25, WRKY26, and WRKY33 coordinate induction of plant thermotolerance. *Planta*. **233**: 1237-1252
- Lin, C. y Thomashow, M. F.** (1992). A cold-regulated *Arabidopsis* gene encodes a polypeptide having potent cryoprotective activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. **183**: 1103-1108
- Liu, M., Yuan, L., Liu, N.-Y., Shi, D.-Q., Liu, J. y Yang, W.-C.** (2009). GAMETOPHYTIC FACTOR 1, involved in pre-mRNA splicing, is essential for megagametogenesis and embryogenesis in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Plant Biology*. **51**: 261-271
- Liu, Q., Liang, X.-H., Uliel, S., Belahcen, M., Unger, R. y Michaelis, S.** (2004). Identification and functional characterization of Lsm proteins in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry*. **279**: 18210-18219
- Liu, Q., Kasuga, M., Sakuma, Y., Abe, H., Miura, S., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K.** (1998). Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **10**: 1391-1406
- Llorente, F., Oliveros, J. C., Martínez-Zapater, J. M. y Salinas, J.** (2000). A freezing-sensitive mutant of *Arabidopsis*, *frs1*, is a new *aba3* allele. *Planta*. **211**: 648-655
- Logemann, J., Schell, J. y Willmitzer, L.** (1987). Improved method for the isolation of RNA from plant tissues. *Analytical Biochemistry*. **163**: 16-20
- Luo, J., Shen, G., Yan, J., He, C. y Zhang, H.** (2006). AtCHIP functions as an E3 ubiquitin ligase of protein phosphatase 2A subunits and alters plant response to abscisic acid treatment. *The Plant Journal*. **46**: 649-657
- Mangeon, A., Magioli, C., Menezes-Salgueiro, A. D., Cardeal, V., Oliveira, C. d., Galvão, V. C., Margis, R., Engler, G. y Sachetto-Martins, G.** (2009). AtGRP5, a vacuole-located glycine-rich protein involved in cell elongation. *Planta*. **230**: 253-265
- Martin, M. L. y Busconi, L.** (2001). A rice membrane-bound calcium-dependent protein kinase is activated in response to low temperature. *Plant Physiology*. **125**: 1442-1449

- Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Mochizuki, Y., Kaminuma, E., Endo, T. A., Okamoto, M., Nambara, E., Nakajima, M. y Kawashima, M.** (2008). Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity and ABA treatment conditions using a tiling array. *Plant and Cell Physiology*. **49**: 1135-1149
- Mayes, A. E., Verdone, L., Legrain, P. y Beggs, J. D.** (1999). Characterization of Sm-like proteins in yeast and their association with U6 snRNA. *The EMBO Journal*. **18**: 4321-4331
- Mazars, C., Thion, L., Thuleau, P., Graziana, A., Knight, M. R., Moreau, M. y Ranjeva, R.** (1997). Organization of cytoskeleton controls the changes in cytosolic calcium of cold-shocked *Nicotiana plumbaginifolia* protoplasts. *Cell Calcium*. **22**: 413-420
- Medina, J., Bagues, M., Terol, J., Pérez-Alonso, M. y Salinas, J.** (1999). The Arabidopsis CBF gene family is composed of three genes encoding AP2 domain-containing proteins whose expression is regulated by low temperature but not by abscisic acid or dehydration. *Plant Physiology*. **119**: 463-470
- Meinke, D., Muralla, R., Sweeney, C. y Dickerman, A.** (2008). Identifying essential genes in *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science*. **13**: 483-491
- Mikkelsen, M. D. y Thomashow, M. F.** (2009). A role for circadian evening elements in cold-regulated gene expression in Arabidopsis. *The Plant Journal*. **60**: 328-339
- Minami, A., Fujiwara, M., Furuto, A., Fukao, Y., Yamashita, T., Kamo, M., Kawamura, Y. y Uemura, M.** (2009). Alterations in detergent-resistant plasma membrane microdomains in *Arabidopsis thaliana* during cold acclimation. *Plant and Cell Physiology*. **50**: 341-359
- Miura, K. y Ohta, M.** (2010). SIZ1, a small ubiquitin-related modifier ligase, controls cold signaling through regulation of salicylic acid accumulation. *Journal of Plant Physiology*. **167**: 555-560
- Miura, K., Jin, J. B., Lee, J., Yoo, C. Y., Stirn, V., Miura, K., Ashworth, E. N., Bressan, R. A., Yun, D.-J. y Hasegawa, P. M.** (2007). SIZ1-mediated sumoylation of ICE1 controls CBF3/DREB1A expression and freezing tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **19**: 1403-1414
- Miura, K., Rus, A., Sharkhuu, A., Yokoi, S., Karthikeyan, A. S., Raghothama, K. G., Baek, D., Koo, Y. D., Jin, J. B., Bressan, R. A., Yun, D.-J. y Hasegawa, P. M.** (2005). The Arabidopsis SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **102**: 7760-7765
- Mizoguchi, T., Irie, K., Hirayama, T., Hayashida, N., Yamaguchi-Shinozaki, K., Matsumoto, K. y Shinozaki, K.** (1996). A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **93**: 765-769
- Moll, C., Von Lyncker, L., Zimmermann, S., Kägi, C., Baumann, N., Twell, D., Grossniklaus, U. y Groß-Hardt, R.** (2008). CLO/GFA1 and ATO are novel regulators of gametic cell fate in plants. *The Plant Journal*. **56**: 913-921

- Monroy, A. F. y Dhindsa, R. S.** (1995). Low-temperature signal transduction: induction of cold acclimation-specific genes of alfalfa by calcium at 25 degrees C. *The Plant Cell*. **7**: 321-331
- Monroy, A. F., Sarhan, F. y Dhindsa, R. S.** (1993). Cold-induced changes in freezing tolerance, protein phosphorylation, and gene expression (evidence for a role of calcium). *Plant Physiology*. **102**: 1227-1235
- Monroy, A. F., Labbé, E. y Dhindsa, R. S.** (1997). Low temperature perception in plants: effects of cold on protein phosphorylation in cell-free extracts. *FEBS Letters*. **410**: 206-209
- Monroy, A. F., Sangwan, V. y Dhindsa, R. S.** (1998). Low temperature signal transduction during cold acclimation: protein phosphatase 2A as an early target for cold-inactivation. *The Plant Journal*. **13**: 653-660
- Muñoz, A. y Castellano, M. M.** (2012). Regulation of translation initiation under abiotic stress conditions in plants: is it a conserved or not so conserved process among Eukaryotes? *Comparative and Functional Genomics*. **2012**: 406357
- Murashige, T. y Skoog, F.** (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**: 473-497
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T. y Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *Journal of Bioscience Bioengineering*. **104**: 34-41
- Nakamichi, N., Kusano, M., Fukushima, A., Kita, M., Ito, S., Yamashino, T., Saito, K., Sakakibara, H. y Mizuno, T.** (2009). Transcript profiling of an Arabidopsis PSEUDO RESPONSE REGULATOR arrhythmic triple mutant reveals a role for the circadian clock in cold stress response. *Plant and Cell Physiology*. **50**: 447-462
- Nakaminami, K., Karlson, D. T. y Imai, R.** (2006). Functional conservation of cold shock domains in bacteria and higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **103**: 10122-10127
- Ner-Gaon, H. y Fluhr, R.** (2006). Whole-genome microarray in Arabidopsis facilitates global analysis of retained introns. *DNA Research*. **13**: 111-121
- Nicol, J. W., Helt, G. A., Blanchard, S. G., Raja, A. y Loraine, A. E.** (2009). The Integrated Genome Browser: free software for distribution and exploration of genome-scale datasets. *Bioinformatics*. **25**: 2730-2731
- Novillo, F., Medina, J. y Salinas, J.** (2007). Arabidopsis CBF1 and CBF3 have a different function than CBF2 in cold acclimation and define different gene classes in the CBF regulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**: 21002-21007
- Novillo, F., Alonso, J. M., Ecker, J. R. y Salinas, J.** (2004). CBF2/DREB1C is a negative regulator of CBF1/DREB1B and CBF3/DREB1A expression and plays a central role in stress tolerance in

Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 3985-3990

Ohtani, M., Demura, T. y Sugiyama, M. (2013). Arabidopsis ROOT INITIATION DEFECTIVE1, a DEAH-Box RNA helicase involved in pre-mRNA splicing, is essential for plant development. The Plant Cell. **25**: 2056-2069

Oono, Y., Seki, M., Satou, M., Iida, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Fujita, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (2006). Monitoring expression profiles of Arabidopsis genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. Functional and Integrative Genomics. **6**: 212-234

Örvar, B. L., Sangwan, V., Omann, F. y Dhindsa, R. S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. The Plant Journal. **23**: 785-794

Ouellet, F., Vázquez-Tello, A. y Sarhan, F. (1998). The wheat *wcs120* promoter is cold-inducible in both monocotyledonous and dicotyledonous species. FEBS Letters. **423**: 324-328

Oyama, T., Shimura, Y. y Okada, K. (2002). The IRE gene encodes a protein kinase homologue and modulates root hair growth in Arabidopsis. The Plant Journal. **30**: 289-299

Pagnussat, G. C., Yu, H.-J., Ngo, Q. A., Rajani, S., Mayalagu, S., Johnson, C. S., Capron, A., Xie, L.-F., Ye, D. y Sundaresan, V. (2005). Genetic and molecular identification of genes required for female gametophyte development and function in Arabidopsis. Development. **132**: 603-614

Palusa, S. G., Ali, G. S. y Reddy, A. S. (2007). Alternative splicing of pre-mRNAs of Arabidopsis serine/arginine-rich proteins: regulation by hormones and stresses. The Plant Journal. **49**: 1091-1107

Pannone, B. K., Xue, D. y Wolin, S. L. (1998). A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. The EMBO Journal. **17**: 7442-7453

Perea-Resa, C., Hernández-Verdeja, T., López-Cobollo, R., Castellano, M. d. M. y Salinas, J. (2012). LSM proteins provide accurate splicing and decay of selected transcripts to ensure normal Arabidopsis development. The Plant Cell. **24**: 4930-4947

Petricka, J. J., Clay, N. K. y Nelson, T. M. (2008). Vein patterning screens and the defectively organized tributaries mutants in *Arabidopsis thaliana*. The Plant Journal. **56**: 251-263

Phillips, J. R., Dunn, M. A. y Hughes, M. A. (1997). mRNA stability and localisation of the low-temperature-responsive barley gene family *blt14*. Plant Molecular Biology. **33**: 1013-1023

Pignocchi, C., Minns, G. E., Nesi, N., Koumproglou, R., Kitsios, G., Benning, C., Lloyd, C. W., Doonan, J. H. y Hills, M. J. (2009). ENDOSPERM DEFECTIVE1 Is a Novel Microtubule-Associated Protein Essential for Seed Development in Arabidopsis. The Plant Cell. **21**: 90-105

Pillai, M. A. y Akiyama, T. (2004). Differential expression of an S-adenosyl-L-methionine

decarboxylase gene involved in polyamine biosynthesis under low temperature stress in japonica and indica rice genotypes. *Molecular Genetics and Genomics*. **271**: 141-149

Plieth, C., Hansen, U. P., Knight, H. y Knight, M. R. (1999). Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *The Plant Journal*. **18**: 491-497

Polisensky, D. H. y Braam, J. (1996). Cold-shock regulation of the *Arabidopsis TCH* genes and the effects of modulating intracellular calcium levels. *Plant Physiology*. **111**: 1271-1279

Popescu, S. C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Gerstein, M., Snyder, M. y Dinesh-Kumar, S. P. (2009). MAPK target networks in *Arabidopsis thaliana* revealed using functional protein microarrays. *Genes and Development*. **23**: 80-92

Prigge, M. J. y Wagner, D. R. (2001). The *Arabidopsis SERRATE* gene encodes a zinc-finger protein required for normal shoot development. *The Plant Cell*. **13**: 1263-1280

Proost, S., Pattyn, P., Gerats, T. y Peer, Y. V. D. (2011). Journey through the past: 150 million years of plant genome evolution. *The Plant Journal*. **66**: 58-65

Purdy, S. J., Bussell, J. D., Nunn, C. P. y Smith, S. M. (2013). Leaves of the *Arabidopsis maltose exporter1* mutant exhibit a metabolic profile with features of cold acclimation in the warm. *PLoS ONE*. **8**: e79412

Quesada, V., Dean, C. y Simpson, G. G. (2005). Regulated RNA processing in the control of *Arabidopsis* flowering. *The International Journal of Developmental Biology*. **49**: 773-780

Saijo, Y., Hata, S., Kyojuka, J., Shimamoto, K. y Izui, K. (2000). Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *The Plant Journal*. **23**: 319-327

Salgado-Garrido, J., Bragado-Nilsson, E., Kandels-Lewis, S. y Séraphin, B. (1999). Sm and Sm-like proteins assemble in two related complexes of deep evolutionary origin. *The EMBO Journal*. **18**: 3451-3462

Salinas, J. (2002). Molecular mechanisms of signal transduction in cold acclimation. In *Plant Signal Transduction* D. S. C. Westernack Oxford University Press, pp. 116-134

Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J. y Dhindsa, R. S. (2001). Cold-activation of *Brassica napus* BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca²⁺ influx. *The Plant Journal*. **27**: 1-12

Sangwan, V., Örvar, B. L., Beyerly, J., Hirt, H. y Dhindsa, R. S. (2002). Opposite changes in membrane fluidity mimic cold and heat stress activation of distinct plant MAP kinase pathways. *The Plant Journal*. **31**: 629-638

Sasaki, K., Kim, M.-H. y Imai, R. (2013). *Arabidopsis* COLD SHOCK DOMAIN PROTEIN 2 is a negative regulator of cold acclimation. *New Phytologist* **198**: 95-102

Seeley, K. A., Byrne, D. H. y Colbert, J. T. (1992). Red light-independent instability of oat

phytochrome mRNA in vivo. *The Plant Cell*. **4**: 29-38

Seo, P. J., Park, M. J. y Park, C. M. (2013). Alternative splicing of transcription factors in plant responses to low temperature stress: mechanisms and functions. *Planta*. **237**: 1415-1424

Seo, P. J., Park, M. J., Lim, M. H., Kim, S. G., Lee, M., Baldwin, I. T. y Park, C. M. (2012). A self-regulatory circuit of CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 underlies the circadian clock regulation of temperature responses in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **24**: 2427-2442

Séraphin, B. (1995). Sm and Sm-like proteins belong to a large family: identification of proteins of the U6 as well as the U1, U2, U4 and U5 snRNPs. *The EMBO Journal*. **14**: 2089-2098

Shi, H., Ye, T., Zhong, B., Liu, R. y Chan, Z. (2014). AtHAP5A modulates freezing stress resistance in *Arabidopsis* through binding to CCAAT motif of AtXTH21. *New Phytologist*. **203**: 554-567

Spiller, M. P., Reijns, M. A. M. y Beggs, J. D. (2007a). Requirements for nuclear localization of the Lsm2-8p complex and competition between nuclear and cytoplasmic Lsm complexes. *Journal of Cell Science*. **120**: 4310-4320

Spiller, M. P., Boon, K.-L., Reijns, M. A. M. y Beggs, J. D. (2007b). The Lsm2-8 complex determines nuclear localization of the spliceosomal U6 snRNA. *Nucleic Acids Research*. **35**: 923-929

Stepanova, A. N., Robertson-Hoyt, J., Yun, J., Benavente, L. M., Xie, D.-Y., Dolezal, K., Schlereth, A., Jürgens, G. y Alonso, J. M. (2008). TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*. **133**: 177-191

Stockinger, E. J., Gilmour, S. J. y Thomashow, M. F. (1997). *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **94**: 1035-1040

Strand, Å., Hurry, V., Gustafsson, P. y Gardeström, P. (1997). Development of *Arabidopsis thaliana* leaves at low temperatures releases the suppression of photosynthesis and photosynthetic gene expression despite the accumulation of soluble carbohydrates. *The Plant Journal*. **12**: 605-614

Suzuki, I., Los, D. A. y Murata, N. (2000). Perception and transduction of low-temperature signals to induce desaturation of fatty acids. *Biochemical Society Transactions*. **28**: 628-630

Swaraz, A. M., Park, Y. D. y Hur, Y. (2011). Knock-out mutations of *Arabidopsis SmD3-b* induce pleiotropic phenotypes through altered transcript splicing. *Plant Science*. **180**: 661-671

Syed, N. H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A. y Brown, J. W. (2012). Alternative splicing in plants-coming of age. *Trends in Plant Science*. **17**: 616-623

Tähtiharju, S. y Palva, T. (2001). Antisense inhibition of protein phosphatase 2C accelerates cold acclimation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. **26**: 461-470

Tähtiharju, S., Sangwan, V., Monroy, A. F., Dhindsa, R. S. y Borg, M. (1997). The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta*. **203**: 442-447

- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. y Kumar, S.** (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. **28**: 2731-2739
- Tan, E. M. y Kunkel, H. G.** (1966). Characteristics of a soluble nuclear antigen precipitating with sera of patients with systemic lupus erythematosus. *Journal of Immunology*. **96**: 464-471
- Tan, X.-Y., Liu, X.-L., Wang, W., Jia, D.-J., Chen, L.-Q., Zhang, X.-Q. y Ye, D.** (2010). Mutations in the *Arabidopsis* nuclear-encoded mitochondrial phage-type RNA polymerase gene *RPOTm* led to defects in pollen tube growth, female gametogenesis and embryogenesis. *Plant and Cell Physiology*. **51**: 635-649
- Tang, W. y Page, M.** (2013). Transcription factor *AtbZIP60* regulates expression of Ca^{2+} -dependent protein kinase genes in transgenic cells. *Molecular Biology Reports*. **40**: 2723-2732
- Teige, M., Scheikl, E., Eulgem, T., Doczi, R., Ichimura, K., Shinozaki, K., Dangl, J. L. y Hirt, H.** (2004). The *MKK2* pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell*. **15**: 141-152
- Telfer, A. y Poethig, R. S.** (1998). *HASTY*: a gene that regulates the timing of shoot maturation in *Arabidopsis thaliana*. *Development*. **125**: 1889-1898
- Terzi, L. C. y Simpson, G. G.** (2008). Regulation of flowering time by RNA processing. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. **326**: 201-218
- Tharun, S.** (2009). Roles of eukaryotic *Lsm* proteins in the regulation of mRNA function. *International Review of Cell and Molecular Biology*. **272**: 149-189
- Tharun, S., He, W., Mayes, A. E., Lennertz, P., Beggs, J. D. y Parker, R.** (2000). Yeast *Sm*-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature*. **404**: 515-518
- Theocharis, A., Clement, C. y Barka, E. A.** (2012). Physiological and molecular changes in plants grown at low temperatures. *Planta*. **235**: 1091-1105
- Thomas, L., Marondedze, C., Ederli, L., Pasqualini, S. y Gehring, C.** (2013). Proteomic signatures implicate cAMP in light and temperature responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Proteomics*. **83**: 47-59
- Thomashow, M. F.** (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **50**: 571-599
- Uemura, M. y Steponkus, P. L.** (1999). Cold acclimation in plants: relationship between the lipid composition and the cryostability of the plasma membrane. *Journal of Plant Research*. **112**: 245-254
- Uno, Y., Furihata, T., Abe, H., Yoshida, R., Shinozaki, K. y Yamaguchi-Shinozaki, K.** (2000). *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National*

Academy of Sciences of the United States of America. **97**: 11632-11637

Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E. y Whelan, J. (2009). Defining the mitochondrial stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant*. **2**: 1310-1324

Van Aken, O., Pecenková, T., van de Cotte, B., De Rycke, R., Eeckhout, D., Fromm, H., De Jaeger, G., Witters, E., Beemster, G. T. S., Inzé, D. y Van Breusegem, F. (2007). Mitochondrial type-I prohibitins of *Arabidopsis thaliana* are required for supporting proficient meristem development. *The Plant Journal*. **52**: 850-864

Van Der Luit, A. H., Olivari, C., Haley, A., Knight, M. R. y Trewavas, A. J. (1999). Distinct calcium signaling pathways regulate calmodulin gene expression in tobacco. *Plant Physiology*. **121**: 705-714

Vanderauwera, S., Vandenbroucke, K., Inzé, A., van de Cotte, B., Mühlenbock, P., De Rycke, R., Naouar, N., Van Gaeve, T., Van Montagu, M. C. E. y Van Breusegem, F. (2012). AtWRKY15 perturbation abolishes the mitochondrial stress response that steers osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **109**: 20113-20118

Vargas, W. A., Pontis, H. G. y Salerno, G. L. (2008). New insights on sucrose metabolism: evidence for an active A/N-Inv in chloroplasts uncovers a novel component of the intracellular carbon tracking. *Planta*. **227**: 795-807

Vaultier, M. N., Cantrel, C., Vergnolle, C., Justin, A. M., Demandre, C., Benhassaine-Kesri, G., Cicek, D., Zachowski, A. y Ruelland, E. (2006). Desaturase mutants reveal that membrane rigidification acts as a cold perception mechanism upstream of the diacylglycerol kinase pathway in *Arabidopsis* cells. *FEBS Letters*. **580**: 4218-4223

Veretnik, S., Wills, C., Youkharibache, P., Valas, R. E. y Bourne, P. E. (2009). Sm/Lsm genes provide a glimpse into the early evolution of the spliceosome. *PLoS Computational Biology*. **5**: e1000315

Veyres, N., Danon, A., Aono, M., Galliot, S., Karibasappa, Y. B., Diet, A., Grandmottet, F., Tamaoki, M., Lesur, D., Pilard, S., Boitel-Conti, M., Sangwan-Norrel, B. S. y Sangwan, R. S. (2008). The *Arabidopsis* *sweetie* mutant is affected in carbohydrate metabolism and defective in the control of growth, development and senescence. *The Plant Journal*. **55**: 665-686

Vigh, L., Los, D. A., Horvath, I. y Murata, N. (1993). The primary signal in the biological perception of temperature: Pd-catalyzed hydrogenation of membrane lipids stimulated the expression of the *desA* gene in *Synechocystis* PCC6803. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **90**: 9090-9094

Viswanathan, C. y Zhu, J.-K. (2002). Molecular genetic analysis of cold-regulated gene transcription. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*. **357**: 877-886

Vogel, J. T., Zarka, D. G., Buskirk, H. A. V., Fowler, S. G. y Thomashow, M. F. (2005). Roles of

the CBF2 and ZAT12 transcription factors in configuring the low temperature transcriptome of Arabidopsis. *The Plant Journal*. **41**: 195-211

Wahl, M. C., Will, C. L. y Lührmann, R. (2009). The spliceosome: Design principles of a dynamic RNP machine. *Cell*. **136**: 701-718

Waibel, F. y Filipowicz, W. (1990). U6 snRNA genes of Arabidopsis are transcribed by RNA polymerase III but contain the same two upstream promoter elements as RNA polymerase II-transcribed U-snRNA genes. *Nucleic Acids Research*. **18**: 3451-3458

Walter, M., Chaban, C., Schutze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Nake, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K. y Kudla, J. (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *The Plant Journal*. **40**: 428-438

Wang, B. B. y Brendel, V. (2004). The ASRG database: identification and survey of *Arabidopsis thaliana* genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biology*. **5**: R102

Wang, B. B. y Brendel, V. (2006). Molecular characterization and phylogeny of U2AF35 homologs in plants. *Plant Physiology*. **140**: 624-636

Wang, C., Tian, Q., Hou, Z., Mucha, M., Aukerman, M. y Olsen, O.-A. (2007). The *Arabidopsis thaliana* *ATPRP39-1* gene, encoding a tetratricopeptide repeat protein with similarity to the yeast pre-mRNA processing protein PRP39, affects flowering time. *Plant Cell Reports*. **26**: 1357-1366

Wang, H., Huang, J., Liang, X. y Bi, Y. (2012a). Involvement of hydrogen peroxide, calcium, and ethylene in the induction of the alternative pathway in chilling-stressed Arabidopsis callus. *Planta*. **235**: 53-67

Wang, L., Luo, Y., Zhang, L., Zhao, J., Hu, Z., Fan, Y. y Zhang, C. (2008). Isolation and characterization of a C-repeat binding transcription factor from maize. *Journal of Integrative Plant Biology*. **50**: 965-974

Wang, X., Wu, F., Xie, Q., Wang, H., Wang, Y., Yue, Y., Gahura, O., Ma, S., Liu, L., Cao, Y., Jiao, Y., Puta, F., McClung, C. R., Xu, X. y Ma, L. (2012b). SKIP Is a Component of the Spliceosome Linking Alternative Splicing and the Circadian Clock in Arabidopsis. *The Plant Cell*. **24**: 3278-3295

Wanner, L. A. y Junttila, O. (1999). Cold-induced freezing tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **120**: 391-400

Wen, J., Lease, K. A. y Walker, J. C. (2004). DVL, a novel class of small polypeptides: overexpression alters Arabidopsis development. *The Plant Journal*. **37**: 668-677

Wisniewski, M., Bassett, C., Norelli, J., Macarasin, D., Artlip, T., Gasic, K. y Korban, S. (2008). Expressed sequence tag analysis of the response of apple (*Malus x domestica* 'Royal Gala') to low temperature and water deficit. *Physiologia Plantarum*. **133**: 298-317

Wolfrain, L. A., Langis, R., Tyson, H. y Dhindsa, R. S. (1993). cDNA sequence, expression, and

transcript stability of a cold acclimation-specific gene, *cas18*, of Alfalfa (*Medicago falcata*) cells. *Plant Physiology*. **101**: 1275-1282

Wu, L., Zhang, Z., Zhang, H., Wang, X. C. y Huang, R. (2008). Transcriptional modulation of ethylene response factor protein JERF3 in the oxidative stress response enhances tolerance of Tobacco seedlings to salt, drought, and freezing. *Plant Physiology*. **148**: 1953-1963

Xiong, L., Lee, B., Ishitani, M., Lee, H., Zhang, C. y Zhu, J. -K. (2001a). FIERY1 encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signaling in Arabidopsis. *Genes and Development*. **15**: 1971-1984

Xiong, L., Gong, Z., Rock, C. D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D. y Zhu, J. -K. (2001b). Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Developmental Cell*. **1**: 771-781

Xiong, L., Lee, H., Ishitani, M., Tanaka, Y., Stevenson, B., Koiwa, H., Bressan, R. A., Hasegawa, P. M. y Zhu, J.-K. (2002). Repression of stress-responsive genes by FIERY2, a novel transcriptional regulator in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **99**: 10899-10904

Xu, J., Yang, J. Y., Niu, Q. W. y Chua, N. H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *The Plant Cell*. **18**: 3386-3398

Yamaguchi-Shinozaki, K. y Shinozaki, K. (1994). A novel *cis*-acting element in an Arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell* **6**: 251-264

Yan, J., Wang, J., Li, Q., Hwang, J. R., Patterson, C. y Zhang, H. (2003). AtCHIP, a U-Box-containing E3 ubiquitin ligase, plays a critical role in temperature stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Physiology*. **132**: 861-869

Yang, T. y Poovaiah, B. W. (2003). Calcium/calmodulin-mediated signal network in plants. *Trends in Plant Science*. **8**: 505-512

Yang, T., Chaudhuri, S., Yang, L., Du, L. y Poovaiah, B. W. (2010). A calcium/calmodulin-regulated member of the receptor-like kinase family confers cold tolerance in plants. *The Journal of Biological Chemistry*. **285**: 7119-7126

Yoo, S. Y., Kim, Y., Kim, S. Y., Lee, J. S. y Ahn, J. H. (2007). Control of flowering time and cold response by a NAC-domain protein in Arabidopsis. *PLoS ONE*. **2**: e642

Yu, X. M., Griffith, M. y Wiseman, S. B. (2001). Ethylene induces antifreeze activity in winter rye leaves. *Plant Physiology*. **126**: 1232-1240

Zaric, B., Chami, M., Rémigy, H., Engel, A., Ballmer-Hofer, K., Winkler, F. K. y Kambach, C. (2005). Reconstitution of two recombinant LSM protein complexes reveals aspects of their architecture, assembly and function. *Journal of Biological Chemistry*. **280**: 16066-16075

- Zarka, D. G., Vogel, J. T., Cook, D. y Thomashow, M. F.** (2003). Cold induction of *Arabidopsis* CBF genes involves multiple ICE (Inducer of CBF Expression) promoter elements and a cold-regulatory circuit that is desensitized by low temperature. *Plant Physiology*. **133**: 910-918
- Zeller, G., Henz, S. R., Widmer, C. K., Sachsenberg, T., Ra, G. y Laubinger, S.** (2009). Stress-induced changes in the *Arabidopsis thaliana* transcriptome analyzed using whole-genome tiling arrays. *The Plant Journal*. **58**: 1068-1082
- Zhang, B., Van Aken, O., Thatcher, L., Clercq, I. D., Duncan, O., Law, S. R., Murcha, M. W., Merwe, M. v. d., Seifi, H. S., Carrie, C., Cazzonelli, C., Radomiljac, J., Höfte, M., Singh, K. B., Breusegem, F. V. y Whelan, J.** (2014). The mitochondrial outer membrane AAA ATPase AtOM66 affects cell death and pathogen resistance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. doi: **10.1111/tpj.12665**
- Zhang, C., Fei, S.-Z., Warnke, S., Li, L. y Hannapel, D.** (2009). Identification of genes associated with cold acclimation in perennial ryegrass. *Journal of Plant Physiology*. **166**: 1436-1445
- Zhang, Z. y Huang, R.** (2010). Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor *TERF2/LeERF2* is modulated by ethylene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*. **73**: 241-249
- Zhang, Z., Zhang, S., Zhang, Y., Wang, X., Li, D., Li, Q., Yue, M., Li, Q., Zhang, Y. E., Xu, Y., Xue, Y., Chong, K. y Bao, S.** (2011). *Arabidopsis* floral initiator SKB1 confers high salt tolerance by regulating transcription and pre-mRNA splicing through altering histone H4R3 and small nuclear ribonucleoprotein LSM4 methylation. *The Plant Cell*. **23**: 396-411
- Zhao, M. G., Chen, L., Zhang, L. L. y Zhang, W. H.** (2009). Nitric reductase-dependent nitric oxide production is involved in cold acclimation and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. **151**: 755-767
- Zheng, H., Rowland, O. y Kunst, L.** (2005). Disruptions of the *Arabidopsis* enoyl-CoA reductase gene reveal an essential role for very-long-chain fatty acid synthesis in cell expansion during plant morphogenesis. *The Plant Cell*. **17**: 1467-1481
- Zhou, L., Hang, J., Zhou, Y., Wan, R., Lu, G., Yin, P., Yan, C. y Shi, Y.** (2014). Crystal structures of the Lsm complex bound to the 3' end sequence of U6 small nuclear RNA. *Nature*. doi:**10.1038/nature12803**
- Zhou, W., Zhou, T., Li, M.-X., Zhao, C.-L., Jia, N., Wang, X.-X., Sun, Y.-Z., Li, G.-L., Xu, M., Zhou, R.-G. y Li, B.** (2012). The *Arabidopsis* J-protein AtDjb1 facilitates thermotolerance by protecting cells against heat-induced oxidative damage. *New Phytologist*. **194**: 364-378
- Zhu, J., Shi, H., Lee, B.-h., Damsz, B., Cheng, S., Stirm, V., Zhu, J.-K., Hasegawa, P. M. y Bressan, R. A.** (2004). An *Arabidopsis* homeodomain transcription factor gene, HOS9, mediates cold tolerance through a CBF-independent pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **101**: 9873-9878

7. ANEXO I: TABLAS

Tabla I. Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Referencia
Genotipado de líneas mutantes		
Salk-8-L	ACTAACTGGCCTCTGAATGGAAG	(Perea-Resa y col., 2012)
Salk-8-R	AAGAAGACCCAAGACTCCGATG	(Perea-Resa y col., 2012)
Salk-4-L	ACGGAGATAGATTTGGAGGATGC	Este trabajo
Salk-4-R	TCCTCCATCATCCACACCACGTC	Este trabajo
Salk-LB	GGCAATCAGCTGTTGCCGTCTCACTGGTG	(Perea-Resa y col., 2012)
Salk-RB	TGATAGTGACCTTAGGCGACTTTTGAACGC	(Perea-Resa y col., 2012)
Sondas para hibridaciones tipo <i>Northern</i>		
LSM1A-F	GAACAGGCTCAACAATTCATTCCA	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM1A-R	TCCTTGATCTCGATTAGGGCATT	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM1B-F	CTTTGATTAAACCAGATTGTATCC	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM1B-R	TCTTAAAAAGGTAAATAGATCCAAAG	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM2-F	CTTGTCAGTGTCACACTTTAGAA	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM2-R	CCATTGGCTCTACATCAGGGAAATA	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM3A-F	ACGACCTAAATGTTCTTGTTGAC	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM3A-R	TCGTAAACGGTAAGAAAGTCACA	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM3B-F	TCGCCGGACATCGTGATG	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM3B-R	ACAAAATTGTTAAGTTCGTGTC	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM4-F	CGGCCGTGGTTGATGCAACAAGTT	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM4-R	CACATATACCACAAAAGGCAAAAGAC	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM5-F	GGATCCCGTCATGGCGAACAATCCTTCACAGC	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM5-R	TCATCCCATGGATTCTCCATCTTCGGGAGACCCAC	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM6A-F	TCATCAACAACAACAACAGTGG	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM6A-R	AACTCAATTTGTTTGCTTGATG	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM6B-F	ATAGCTCTCTTCATCACCATG	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM6B-R	CTTTGCTGTCGAAGAATAATTAAG	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM7-F	GTGATGCTTGCTCTACCAACC	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM7-R	TGGTTAAGGAGATTTTGCTTT	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM8-F	GAGCTTGATGCTAGTCTGGATT	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM8-R	TCCGTCCAAAAGATTGTATGATT	(Perea-Resa y col., 2012)
KIN1A	GGCACCACACTCCCTTAG	(Kurkela y Borg-Franck, 1992)
KIN1B	GAATATAAGTTTGCTCGTC	(Kurkela y Borg-Franck, 1992)
U6snRNA-5'	ATATACAGCTAGTGTCGAAGTAGTGATTGC	(Perea-Resa y col., 2012)
U6snRNA-3'	AATTTGACCATTTCTCGATTATG	(Perea-Resa y col., 2012)
U3snoRNA-5'	GCTGCTACCTCTGTTTCCTTG	(Perea-Resa y col., 2012)
U3snoRNA-3'	ACCTGTGACACCGCGTG	(Perea-Resa y col., 2012)
U4snRNA-5'	GGGCAATGACGAGCTAATG	(Perea-Resa y col., 2012)
U4snRNA-3'	GAAATTCTCGAAGGCCAAGAC	(Perea-Resa y col., 2012)
Clonajes		
LSM8-GFP-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTACAGAACTCGTGTGTTGCGGTT	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM8-GFP-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTATGCACTACGGGTTTCAACG-GATG	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM4-GFP-F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGTAGATCACATTTGATTACACATA	(Perea-Resa y col., 2012)
LSM4-GFP-R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTACACACGGCCGCGACCTGCTC-CTGT	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM8-F	GGGAATCCATGGCGGCACTACTGGA	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM8-R	GGCTCGAGTCTATGCACTACGGGTTTCAA	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM4-F	CCCCCGGATGCTTCTCTATCGCTG	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM4-R	CCCTCGAGTAAACCACGGCCGCGACCTGC	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM2-F	GGGGATCCATGTTGTTCTTTCTTACTTCAAGG	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM2-R	CCGGATCCACAGCCACCCTAGCTTCTCT	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM5-F	GGCTCGAGATGGCGAACAATCCTTCA	(Perea-Resa y col., 2012)

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Referencia
BiFC-LSM5-R	GGCTCGAGTCTTCTCCATCTTCGGGA	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM1A-F	GGGGATCCTATGTCTGGGCTGCTCTGA	(Perea-Resa y col., 2012)
BiFC-LSM1A-R	GGCCCGGGCTCATCGAGATCAAGGAATC	(Perea-Resa y col., 2012)
qRT-PCR		
NAC13_F	TGGATCATCGTGGGTGCAGGA	(Perea-Resa y col., 2012)
NAC13_R	ACCAGGCGCCTCACCAAAC	(Perea-Resa y col., 2012)
WRKY25_F	AGAGGAGGAACAACCTGAG	(Perea-Resa y col., 2012)
WRKY25_R	TGTCTGAACCACAACTCTTG	(Perea-Resa y col., 2012)
AT1G35710_F	CGAACTCATCAAAGTCTCTC	(Perea-Resa y col., 2012)
AT1G35710_R	CAGTGTAGTGAGGTTTAACTCT	(Perea-Resa y col., 2012)
BCS1_F	CTACCTTCAAACTCTAGCAAT	(Perea-Resa y col., 2012)
BCS1_R	CCAACCCTTTTATAGAAGTCTC	(Perea-Resa y col., 2012)
ACD6_F	CTGGTATATTCTCAAGACTTTTATG	(Perea-Resa y col., 2012)
ACD6_R	GATGATTATTCGGAACACGC	(Perea-Resa y col., 2012)
GRP5_F	CCTTACTGTGCGGCTCTTTTGC	(Perea-Resa y col., 2012)
GRP5_R	GTCCTCGAGACCACTCTTCAG	(Perea-Resa y col., 2012)
MER15_F	TTCTTCACGACTCTTCTCG	(Perea-Resa y col., 2012)
MER15_R	CATTTCCCAAGCTACGT	(Perea-Resa y col., 2012)
CLH1_F	TTCTACTCTGACGTTCTTAACC	(Perea-Resa y col., 2012)
CLH1_R	AGTTTATCACACTTCCAGCAT	(Perea-Resa y col., 2012)
At1g30260_F	CTTCAGCTTCATGCACTTC	(Perea-Resa y col., 2012)
At1g30260_R	GAAAATTGGTTTAGTCTTGAAAC	(Perea-Resa y col., 2012)
CER10_F	CCGCTGAGAAAGATATTGATG	(Perea-Resa y col., 2012)
CER10_R	GCTTCTAAAGGAATGGAGGAA	(Perea-Resa y col., 2012)
RAV2_F	GCTAAATCGCCGCTCTCCAGAACG	(Perea-Resa y col., 2012)
RAV2_R	TCCTACGACATCGCAGCTTGTA	(Perea-Resa y col., 2012)
bZIP60_F	CGATGATGCTGTGGCTAAAA	(Iwata y col., 2008)
bZIP60_R	TCTCAAGCATTCTCTTCGAGAT	(Iwata y col., 2008)
SZF1_F	TAACGCAGCTAGAGACTACAGG	Este trabajo
SZF1_R	CTTCTCTCAGACACCACAGTAC	Este trabajo
WRKY33_F	GCACCATATACACTTCAGATGCTG	Este trabajo
WRKY33_R	CTAGAGAATCCACCACCAACAAAG	Este trabajo
GI_F	TGTCGTCTACCAGCAACAATACG	Este trabajo
GI_R	CTTTGATGGGTATGGAGCTTTGGT	Este trabajo
AOX1A_F	CTATTGGGGTGTGAACCT	Este trabajo
AOX1A_R	TATCGTTATATCAGCTTTATACGTT	Este trabajo
NDB2_F	TAAGCAAGTGAGCTGGCGTAC	Este trabajo
NDB2_R	GGAGGTTGAAAATCAGATGCTACT	Este trabajo
mtHSC70-1_F	AGAGAAGAGCTTGAGTGAATACAGA	Este trabajo
mtHSC70-1_R	ATAGCAGTCCTGAGATCAGACAC	Este trabajo
PP2CA_F	TGGAGCTAGGGTTCTTGAGT	Este trabajo
PP2CA_R	ATCAAACACTCATCCTCATCAGTTC	Este trabajo
LHCB2.4_F	AACGACCCTAAAGCCATCCAAC	Este trabajo
LHCB2.4_R	AGATGCTCTGAGGAGTAGACTTG	Este trabajo
PNSL2_F	AAGAGACATGAGGGAGATGTTGG	Este trabajo
PNSL2_R	TGGTGAGATCCTGAGACAGATAAG	Este trabajo
FKBP-like_F	AAAGGACTTGATCTTGGTGTGAAG	Este trabajo
FKBP-like_R	GTAGCGTTTGGAGGAATCTCTTG	Este trabajo
PIP2;1_F	GATGACCACTGGATAITTTGGGTT	Este trabajo
PIP2;1_R	CACTTCTGAATGATCCAAGAGACTTA	Este trabajo
AT4G26410_F	GAGCTGAAGTGGCTTCAATGAC	(Czechowski y col., 2005)
AT4G26410_R	GGTCCGACATACCCATGATCC	(Czechowski y col., 2005)
Retención de intrones		
S2g43850_E1_F	ACCGCGCAGCTCAAACGAGG	(Perea-Resa y col., 2012)

Oligonucleótido	Secuencia 5' a 3'	Referencia
S2g43850_I1_R	CTAATTCACCAGACAACATAAAAATGTCAAC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_CKL5_E5_F	GAGTTCATTCTAAGTCGTATCTTC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_CKL5_I5_R	CTAGAGAAAGAGACCAATCAGTCATA	(Perea-Resa y col., 2012)
S2G33205_E6_F	GTTCTTTTGGTTTGGTCATGTCAATAG	(Perea-Resa y col., 2012)
S2G33205_I6_R	TTTAATGCAAAGCATCAGTATTCGAAGC	(Perea-Resa y col., 2012)
S1G19340_E4_F	CTAAATCTGAAGAAGGTACTAATCTTATAG	(Perea-Resa y col., 2012)
S1G19340_I4_R	CTAAAACAAGAACCAAGAACATTGGTCA	(Perea-Resa y col., 2012)
S_AME3_E10_F	TGAGGCTCTCTTCAGACGCA	(Perea-Resa y col., 2012)
S_AME3_I10_R	CTACAAAAACATAACGACCATACATGC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_PRMT4A_I3_F	GTGCGAATCAATGTGCTAATTCCC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_PRMT4A_E4_R	TTTGGCTGAAGCAGCCTCAATCTT	(Perea-Resa y col., 2012)
S1g17960_E9_F	CGAAATGGAGGCACCTGTGATGATA	(Perea-Resa y col., 2012)
S1g17960_I9_R	CTGTTTGAATGTACGTGCAAAGGAA	(Perea-Resa y col., 2012)
S3g59390_E3_F	AATGTGTGTGATGCTTTGTCTATTGGA	(Perea-Resa y col., 2012)
S3g59390_I3_R	CTTCAAGCGAAACCACAAAACAAAGA	(Perea-Resa y col., 2012)
S_DCL1_I10_F	GTGGACATAATAGTTTGTGTTTATCTTAC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_DCL1_E11_R	TCCGCCACACCTTCAGGATAG	(Perea-Resa y col., 2012)
S_OLI2_E15_F	AAGGAGGACAAGAGAGGTAAAAAGGAT	(Perea-Resa y col., 2012)
S_OLI2_I15_R	GCAAACGTGATTATACAAATCATTGTCA	(Perea-Resa y col., 2012)
S_EMB2785_E9_F	TTAATGGCAGAAGCTGAAACAAATCT	(Perea-Resa y col., 2012)
S_EMB2785_I9_R	CTGTTAGACACGACAGAAATTAATTAC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_EMB2016_E5_F	GAAGTCACTTGGATCAGTTGAAGAT	(Perea-Resa y col., 2012)
S_EMB2016_I5_R	GCATTGTGACGCTTTAGGTAAG	(Perea-Resa y col., 2012)
S_GUT2_E2_F	ACTTCTTTGTTGTGCCCATGAC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_GUT2_I2_R	CTGTTTAATGTCAATCAAATCTTCAATTCC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_ARP4_F	TACCAGCATTATATGTCACTATAAGC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_ARP4_R	TTGAGATCCTACATAGAGCTTGC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_ANT_F	ACATAGATGGACTGGTAGATATGAAG	(Perea-Resa y col., 2012)
S_ANT_R	TGAGAAGAAGATCATCAAATCATTATC	(Perea-Resa y col., 2012)
S_EMF2_I1_F	ACTGTTCAAGTTTACATTTTTTCTCTG	Este trabajo
S_EMF2_E2_R	AAGAGGTTTCACGACTAACAAGAG	Este trabajo
S_PRR5_I2_F	TACGTTGATATATACATCTTTTCTTCCATC	Este trabajo
S_PRR5_E3_R	AAGATAATCAGCCGACCTTTCAA	Este trabajo
S_TIC110_E1_F	CTCCGACCAACTATCAGTATCTAC	Este trabajo
S_TIC110_I1_R	ACATATAAGAAGGATCGTTTAAGCAAAC	Este trabajo
S1G34380_I2_F	TGGGTAAACTGTTTAATACTCAATGTTC	Este trabajo
S1G34380_E3_R	TCTGCTTCATGCCCTTCTATTCTA	Este trabajo
S_HDA2_I4_F	GTAGAAGAATCGTTTGTGCTTACTAC	Este trabajo
S_HDA2_E5_R	CGCAAAGTGAATACAGAGAGAAATATC	Este trabajo
S_SWEETIE_E4_F	TTTGTGCGACAAGAAGCCTTTATC	Este trabajo
S_SWEETIE_I4_R	ACAGAGGTATGTATATATTCAGAGATAG	Este trabajo
S_INV-E_I6_F	GATTCTCTCTTTCCCTTTTGGTTC	Este trabajo
S_INV-E_E7_R	ATCTCTGGTCTACCATTTTGATGC	Este trabajo
S_COR15A_E2_F	ATCCTCGATGACCTCAAC	Este trabajo
S_COR15A_I2_R	CAAAGGTTTCAAAACACATATCCA	Este trabajo
TUBULIN_F	TTTGGAGCCTGGGACTATGGAT	Este trabajo
TUBULIN_R	ACGGGGGAATGGGATGAGAT	Este trabajo

Tabla II. Intrones retenidos en el mutante *lsm8-1* en condiciones control

Intrones con mayor señal de hibridación en el mutante *lsm8-1* que en el WT. Los genes implicados en procesos de desarrollo están marcados en negrita.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT1G01040	10	DCL1	Encodes a Dicer homolog. Mutations in this locus can result in embryo lethality. Other mutants convert the floral meristems to an indeterminate state, others show defects in ovule development.
AT1G01950	1	ARK2	Encodes a member of the armadillo/beta-catenin repeat kinesin motor family. Mutants have twisted roots due to abnormal cell file rotation.
AT1G02080	8, 40		Transcription regulators.
AT1G03030	11		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT1G03910	10		Cactin protein, cactus-binding domain, C-terminal (InterPro:IPR019134).
AT1G04020	10	BARD1	Encodes a protein containing two tandem BRCT domains. Loss of function mutations cause defects in meristem organization due to failure to repress WUS.
AT1G04590	1		Pentatricopeptide repeat (PPR)superfamily protein
AT1G04650	6		Unknown protein.
AT1G04810	6		26S proteasome regulatory complex, non-ATPase subcomplex, Rpn2/Psmd1 subunit.
AT1G05510	2		Protein is tyrosine-phosphorylated in response to ABA in seeds.
AT1G05570	38	CALS1	Encodes a callose synthase 1 catalytic subunit. Member of Glycosyltransferase Family-48.
AT1G07060	2		Unknown protein.
AT1G07650	5		Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase.
AT1G08040	10		Protein of unknown function (DUF707).
AT1G08310	2		Alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT1G08810	2	MYB60	Putative transcription factor of the R2R3-MYB gene family.
AT1G08920	13	ESL1	Encodes ESL1, a transporter for monosaccharides.
AT1G09380	5		Nodulin MtN21/Eam A-like transporter family protein.
AT1G09450	5, 7, 13	Haspin	Encodes a protein kinase that plays a role in mitotic cell division.
AT1G09940	1	HEMA2	Encodes glutamyl-tRNA reductase. Involved in heme biosynthesis.
AT1G10050	3, 4		Encodes a putative glycosyl hydrolase family 10 protein (xylanase).
AT1G10820	7		Protein of unknown function (DUF3755).
AT1G11340	4		S-locus lectin protein kinase family protein.
AT1G14530	10	THH1	Protein of unknown function DUF1084 (InterPro:IPR009457).
AT1G14880	2	PCR1	Molecular_function unknown
AT1G15740	5		Leucine-rich repeat family protein.
AT1G16040	7		Molecular_function unknown.
AT1G16705	2		p300/CBP acetyltransferase-related protein-related.
AT1G17340	5		Phosphoinositide phosphatase family protein.
AT1G17350	5		NADH:ubiquinone oxidoreductase intermediate-associated protein 30.
AT1G17960	9		Threonyl-tRNA synthetase.
AT1G18190	7	GC2	This gene is predicted to encode a protein that functions as a Golgi apparatus structural component known as a golgin in mammals and yeast.
AT1G18330	1	EPR1	EARLY-PHYTOCHROME-RESPONSIVE 1
AT1G18520	1	TET11	Member of TETRASPANIN family
AT1G18660	10		Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein.
AT1G19180	1	JAZ1	JAZ1 is a nuclear-localized protein involved in jasmonate signaling.
AT1G19220	6	ARF19	Encodes an auxin response factor.
AT1G19340	4		Methyl transferase MT-A70 family protein.
AT1G19715	6		Mannose-binding lectin super family protein.
AT1G20110	4		RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein.
AT1G21170	17	SEC5B	BEST <i>Arabidopsis thaliana</i> protein match is: exocyst complex component
AT1G21380	8		Target of Myb protein 1.
AT1G21750	6	PDIL1-1	Encodes a protein disulfide isomerase-like (PDIL) protein.
AT1G22020	3	SHM6	Encodes a putative serine hydroxymethyltransferase.
AT1G22650	4	A/N-InvD	Plant neutral invertase family protein.
AT1G23160	3		Auxin-responsive GH3 family protein.
AT1G23420	5	INO	Essential for formation and asymmetric growth of the ovule outer integument.
AT1G24190	17	SNL3	Enhances AtERF7-mediated transcriptional repression.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT1G24265	12		Protein of unknown function (DUF1664).
AT1G24490	6	ALB4	ALB4 is required for proper chloroplast biogenesis.
AT1G26160	3		Metal-dependent phosphohydrolase.
AT1G26370	10		RNA helicase family protein.
AT1G26750	1		Unknown protein.
AT1G27440	2	GUT2	INVOLVED IN: secondary cell wall biogenesis.
AT1G27460	1	NPGR1	Encodes a calmodulin-binding protein.
AT1G27720	9	TAF4b	Ttranscription initiation factor activity
AT1G27880	12		DEAD/DEAH box RNA helicase family protein.
AT1G28060	4		Pre-mRNA-splicing factor 3.
AT1G28210	15	ATJ1	DnaJ homolog AtJ1 (atj)
AT1G28530	5		Unknown protein.
AT1G28580	2		GD5L-like Lipase/Acyl hydrolase superfamily protein.
AT1G30060	3		COP1-interacting protein-related.
AT1G30270	2	CIPK23	Positive regulator of the potassium transporter AKT1.
AT1G30410	12	ABCC12	Member of MRP subfamily.
AT1G30470	7		SIT4 phosphatase-associated family protein.
AT1G30910	1		Molybdenum cofactor sulfurase family protein.
AT1G33607	1		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT1G34130	3	STT3B	Encodes homolog of yeast STT3, a subunit of oligosaccharyl transferase.
AT1G35250	2		Thioesterase superfamily protein.
AT1G48280	1		Hydroxyproline-rich glycoprotein family protein.
AT1G48310	1	CHR18	Helicase activity, DNA binding, nucleic acid binding, ATPbinding.
AT1G49100	7		Leucine-rich repeat protein kinase family protein.
AT1G49950	5	TRB1	Encodes a telomeric DNA binding protein.
AT1G50000	6		Methyl transferases.
AT1G50200	16	ALATS	FUNCTIONS IN: alanine-tRNA ligase activity.
AT1G50300	1	TAF15	RNA binding, nucleotide binding, zinc ion binding, nucleic acid binding.
AT1G50360	16	VIIIA	Member of Myosin-like proteins
AT1G50390	1		pfkB-like carbohydrate kinase family protein.
AT1G50510	7		Indigoidine synthase A family protein.
AT1G50890	5		ARM repeat superfamily protein.
AT1G51090	1		Heavy metal transport/detoxification superfamily protein.
AT1G51880	11	RHS6	Kinase activity; INVOLVED IN: protein amino acid phosphorylation.
AT1G53750	5	RPT1A	26S proteasome AAA-ATPase subunit RPT1a (RPT1a) mRNA.
AT1G54340	7	ICDH	NADP-specific isocitrate dehydrogenase (ICDH)
AT1G54560	13	XIE	Member of Myosin-like proteins.
AT1G54960	3	NP2	Member of MEKK subfamily.
AT1G55600	1, 4	WRKY10	Member of WRKY Transcription Factor; Group I.
AT1G55690	3		Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein.
AT1G55810	10	UKL3	Gene predicted to encode proteins with UPRT domains.
AT1G56090	2		Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein.
AT1G56553	1		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT1G57700	2		Protein kinase superfamily protein.
AT1G58060	11		RNA helicase family protein.
AT1G59980	2	ARL2	FUNCTIONS IN: unfolded protein binding, heat shock protein binding.
AT1G60850	1	ATRPAC42	DNA-directed RNA polymerase activity, protein dimerization activity.
AT1G63290	3		Aldolase-type TIM barrel family protein.
AT1G63770	20		Peptidase M1 family protein.
AT1G63880	3		Encodes a TIR-NBS-LRR class of disease resistance protein.
AT1G64960	3	HEB1	ARM repeat superfamily protein.
AT1G65070	2		DNA mismatch repair protein MutS, type2.
AT1G65580	6	FRA3	FUNCTIONS IN: inositol or phosphatidylinositol phosphatase activity
AT1G65780	6		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT1G66020	5		Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein.
AT1G66800	3		Its expression is enriched in non-root hair cells.
AT1G66960	10	LUP5	Terpenoid cyclases family protein
AT1G67110	2	CYP735A2	Member of CYP709A.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT1G67140	7	SWEETIE	INVOLVED IN: trehalose metabolic process, starch metabolic process.
AT1G67320	6	EMB2813	DNA primase, large subunit family.
AT1G67490	14	GCS1	Encodes an alpha-glucosidase I enzyme that catalyzes the first step in N-linked glycan processing.
AT1G67890	9		PAS domain-containing protein tyrosine kinase family protein;
AT1G68750	5	PPC4	Encodes one of four Arabidopsis PEP carboxylase proteins.
AT1G68990	6	MGP3	Mutation in MGP 3 caused defective embryo development.
AT1G69450	3		Early-responsive to dehydration stress protein (ERD4);
AT1G69480	10		EXS (ERD1/XPR1/SYG1) family protein.
AT1G70100	4		Unknown protein.
AT1G70560	3	TAA1	TAA1 is involved in the shade-induced production of IPA, a precursor to IAA. It is also involved in regulating many aspects of plant growth and development.
AT1G70800	2	EHB1	Encodes a novel NPH3/phototropin binding factor.
AT1G71300	17		Vps52/Sac2 family.
AT1G71530	3		Protein kinase superfamily protein.
AT1G73010	2	PS2	Encodes PPsase1, a pyrophosphate-specific phosphatase.
AT1G73310	1	scpl4	Serine-type carboxypeptidase activity; INVOLVED IN: proteolysis.
AT1G74180	2	RLP14	INVOLVED IN: signal transduction.
AT1G74710	5, 6	EDS16	Encodes a protein with isochorismate synthase activity.
AT1G75850	17	VPS35B	Vacuolar protein sorting-associated protein 35
AT1G76950	7	PRAF1	FUNCTIONS IN: chromatin binding, zinc ion binding, Ran GTPase binding.
AT1G76955	1		Expressed protein.
AT1G76970	4		Target of Myb protein 1; FUNCTIONS IN: protein transporter activity.
AT1G77410	12	BGAL16	INVOLVED IN: lactose catabolic process.
AT1G77450	1	NAC032	INVOLVED IN: multicellular organismal development, regulation of transcription.
AT1G78650	6	POLD3	Similar to DNA polymerase delta.
AT1G78800	5		UDP-Glycosyl transferase superfamily protein.
AT1G78910	3,4		Pseudouridine synthase family protein.
AT1G79180	2	MYB63	Member of the R2R3 factor gene family.
AT1G79190	7		ARM repeat superfamily protein
AT1G79280	16	NUA	Encodes a protein with similarity to vertebrate Tpr, a long coiled-coil proteins of nuclear pore inner basket filaments. Mutations affect flowering time regulation and other developmental processes.
AT1G80070	20	SUS2	Genetic locus involved in embryogenesis.
AT1G80410	4	EMB2753	INVOLVED IN: embryo development ending in seed dormancy.
AT2G01690	13		ARM repeat superfamily protein.
AT2G02770	6		4'-phosphopantetheinyl transferase superfamily.
AT2G04160	3	AIR3	Encodes a protein similar to subtilisin-like serine protease.
AT2G04360	5		Unknown protein.
AT2G04400	4		Aldolase-type TIM barrel family protein.
AT2G04845	2		Acyl-CoAN-acyltransferases (NAT) superfamily protein.
AT2G05710	1, 17	ACO3	Encodes an aconitase that can catalyze the conversion of citrate to isocitrate.
AT2G06990	5	HEN2	Putative DEXH-box RNA helicase that acts redundantly with HEN1, HUA1, and HUA2 in the specification of floral organ identity in the third whorl.
AT2G07560	8	HA6	Cation transport, metabolic process, ATP biosynthetic process.
AT2G15230	8	LIP1	Lipase active on medium and short chain triacylglycerols.
AT2G17010	4		Mechano sensitive ion channel family protein.
AT2G17840	3	ERD7	Identified as drought-inducible gene by differential hybridization.
AT2G19280	2		Pentatricopeptide repeat (PPR) superfamily protein.
AT2G19470	5	CKL5	FUNCTIONS IN: protein serine/threonine kinase activity, protein kinase activity, kinase activity, ATP binding.
AT2G19920	13		RNA-dependent RNA polymerase family protein.
AT2G20290	1	XIG	Member of Myosin-like proteins.
AT2G20440	9		Ypt/Rab-GAP domain of gyp1p superfamily protein.
AT2G20900	1	DGK5	FUNCTIONS IN: diacylglycerol kinase activity
AT2G21550	7		Bifunctional dihydrofolate reductase/thymidylate synthase.
AT2G22600	3		RNA-binding KH domain-containing protein.
AT2G23390	7		Protein of unknown function DUF482
AT2G23630	7	SKS16	INVOLVED IN: oxidation reduction.
AT2G23910	1		NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT2G24390	3		AlG2-like (avirulence induced gene) family protein.
AT2G24640	2	UBP19	Cysteine-type endopeptidase activity, ubiquitin thiolesterase activity.
AT2G25110	5	SDF2	Encodes an endoplasmic reticulum protein SDF2.
AT2G25350	2		Phox (PX) domain-containing protein.
AT2G25600	3	SPIK	Member of the Shaker family potassium ion (K ⁺) channel. Mutant plants have impaired pollen-tube growth.
AT2G25660	14	EMB2410	INVOLVED IN: embryo development ending in seed dormancy.
AT2G26000	7, 9	BRIZ2	Encodes a RING domain containing protein BRIZ2. BRIZ1 and BRIZ2 proteins form a heteromeric E3 ligase complex required for seed germination and post-germination growth.
AT2G27120	16	TIL2	Protein with similarity to DNA polymerase epsilon catalytic subunit.
AT2G27170	26	TTN7	Encodes a member of the Arabidopsis cohesin complex that is essential for viability and sister chromatid alignment.
AT2G27900	7		Protein of unknown function DUF2451.
AT2G31010	11		Protein kinase superfamily protein.
AT2G31060	9	EMB2785	Elongation factor family protein.
AT2G31600	2		Unknown protein.
AT2G31865	5	PARG2	INVOLVED IN: defense response to fungus.
AT2G32295	6		FUNCTIONS IN: molecular function unknown.
AT2G33205	6		Serinc-domain containing serine and sphingolipid biosynthesis protein.
AT2G33210	9	HSP60-2	INVOLVED IN: inflammatory response, response to salt stress.
AT2G35720	5	OWL1	J-domain protein involved in perception of very low light fluences.
AT2G36670	10		Eukaryotic aspartyl protease family protein.
AT2G36960	10	TKI1	<i>Arabidopsis thaliana</i> myb/SANT domain protein.
AT2G37770	1	ChIAKR	Encodes an NADPH-dependent aldo-keto reductase.
AT2G38020	2	VCL1	Necessary for proper vacuole morphogenesis in Arabidopsis.
AT2G39340	11	SAC3A	SAC3/GANP/Nin1/mts3/elf-3p25 family.
AT2G40480	1		Plant protein of unknown function (DUF827).
AT2G41220	30	GLU2	Similar to ferredoxin dependent glutamate synthase (Fd-GOGAT).
AT2G41830	1		Uncharacterized protein.
AT2G42240	5		RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein.
AT2G43535	1		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT2G43850	1		Integrin-linked protein kinase family.
AT2G44190	2	EDE1	Encodes a novel microtubule binding protein. EDE1 is essential during the mitotic and cytokinetic stages that generate the endosperm and embryo.
AT2G44900	4	ARABIDILLO-1	ARABIDILLO-1 promote lateral root development
AT2G44910	2	HB4	Encodes a homeodomain protein.
AT2G44970	5		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT2G45540	17		WD-40 repeat family protein/beige-related.
AT2G45670	8		Calcineurin B subunit-related.
AT2G45910	5		U-box domain-containing protein kinase family protein.
AT2G46440	3	CNGC11	Member of Cyclic nucleotide gated channel family.
AT2G46890	2		FUNCTIONS IN: oxido reductase activity.
AT2G47430	2	CKI1	Encodes a putative plasma membrane-bound hybrid histidine kinase and cytokinin sensor that is expressed within the female gametophyte.
AT3G01290	3	HIR2	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family.
AT3G01610	4	CDC48C	AAA-type ATPase. Over 90% homologous to CDC48a
AT3G02220	3		Unknown protein.
AT3G02350	2	GAUT9	Encodes a protein with putative galacturonosyltransferase activity.
AT3G02920	5	RPA32B	FUNCTIONS IN: nucleic acid binding.
AT3G03270	1		Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein.
AT3G03305	1		Calcineurin-like metallo-phosphoesterase superfamily protein.
AT3G03630	3	CS26	Encodes a protein that possesses S-sulfocysteine synthase activity.
AT3G05040	13	HST	Involved in timing of shoot maturation. Mutants flower early and have small, curled leaves and reduced abundance of certain miRNA species.
AT3G05680	5	EMB2016	INVOLVED IN: embryo development ending in seed dormancy.
AT3G06630	10		Protein kinase family protein.
AT3G07400	9		Lipase class 3 family protein.
AT3G09330	7		Transmembrane aminoacid transporter family protein.
AT3G09670	1		Tudor/PWWP/MBT superfamily protein.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT3G09690	4		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT3G09740	1	SYP71	Syntaxin of plants 71 (SYP71)
AT3G09840	7	CDC48	Encodes a cell division cycle protein. Mutants in which the expression of CDC48A is altered show defects in cytokinesis, cell expansion and cell differentiation.
AT3G10500	1	NAC053	INVOLVED IN: multicellular organismal development, regulation of transcription.
AT3G10690	14	GYRA	FUNCTIONS IN: DNA topoisomerase activity, catalytic activity, ATP binding.
AT3G10710	1	RHS12	INVOLVED IN: cell wall modification.
AT3G11960	8		Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF) A subunit protein
AT3G11980	4	MS2	Similar to fatty acid reductases.
AT3G12203	12	scpl17	INVOLVED IN: proteolysis.
AT3G13065	4	SRF4	Protein serine/threonine kinase activity, kinase activity, ATP binding.
AT3G13070	11		CBS domain- / transporter associated domain-containing protein.
AT3G13330	6	PA200	Encodes a protein that interacts with the 26S proteasome.
AT3G14390	7		Pyridoxal-dependent decarboxylase family protein.
AT3G14410	3		Nucleotide/sugar transporter family protein.
AT3G14840	7		Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase.
AT3G16820	1		F-box and associated interaction domains-containing protein.
AT3G17850	11		Protein kinase superfamily protein.
AT3G19040	4	HAF2	It is required in integrating light signals to regulate gene expression and growth.
AT3G19420	2	PEN2	FUNCTIONS IN: phosphatase activity
AT3G19515	8		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Apoptosis inhibitory 5
AT3G19630	6		Radical SAM superfamily protein.
AT3G20280	3		RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein.
AT3G21465	3		Unknown protein.
AT3G22880	6	DMC1	Expression of the AtDMC1 is restricted to pollen mother cells in anthers and to megaspore mother cells in ovules.
AT3G23460	2		S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily.
AT3G24010	5	ING1	ING1 encodes a member of the Inhibitor of Growth family of nuclear-localized Phd domain containing homeodomain proteins.
AT3G24495	9	MSH7	Encodes a DNA mismatch repair homolog of human MutS gene, MSH6.
AT3G25510	1		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRRclass), putative.
AT3G26050	4		TPX2 (targeting protein for Xklp2) protein family.
AT3G27130	2		BEST <i>A. thaliana</i> protein match is: P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT3G27670	10	RST1	Mutant plants showed alterations in the cuticular wax profiles and embryo development.
AT3G28007	1, 2	SWEET4	Nodulin MtN3 family protein.
AT3G28140	1		RNA ligase/cyclic nucleotide phosphodiesterase family protein.
AT3G28155	2		BEST <i>A. thaliana</i> protein match is: ARM repeat superfamily protein.
AT3G29260	1		NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein.
AT3G33494	2		Unknown protein.
AT3G43920	15, 18	DCL3	Encodes a ribonuclease III family protein that is required for endogenous RDR2-dependent siRNA (but not miRNA) formation.
AT3G44190	3		FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein.
AT3G44560	9	FAR8	INVOLVED IN: microsporogenesis, metabolic process.
AT3G44740	5		Class II aaRS and biotin synthetases superfamily protein.
AT3G45310	5		Cysteine proteinases superfamily protein.
AT3G45530	1		Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein.
AT3G45890	2	RUS1	Encodes a protein that contains DUF647.
AT3G46180	6	UTR5	FUNCTIONS IN: galactose transmembrane transporter activity.
AT3G46400	7		Leucine-rich repeat protein kinase family protein.
AT3G47060	8	ftsH7	Encodes an FtsH protease that is localized to the chloroplast
AT3G47790	16	ABCA8	Member of ATH subfamily
AT3G48160	4	DEL1	E2F-like protein, an inhibitor of the endocycle, preserves the mitotic state of proliferating cells.
AT3G48190	23, 60	ATM	Encodes a homolog of the human ATM gene.
AT3G49400	6		Transducin/WD40 repeat-like super family protein.
AT3G50590	16		Transducin/WD40 repeat-like super family protein.
AT3G52200	7	LTA3	Dihydrolipoamide S-acetyl transferase (LTA3) mRNA, nuclear
AT3G53590	5		Leucine-rich repeat protein kinase family protein.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT3G54250	4		GHMP kinase family protein.
AT3G54320	3	WRI1	WRI1 encodes transcription factor of the AP2/ERWEBP class. Mutants have wrinkled seed phenotype.
AT3G55410	5		2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component.
AT3G56510	2		RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein.
AT3G56720	6		Unknown protein.
AT3G56960	4	PIP5K4	Encodes a protein with phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase activity that plays a role in pollen tip growth.
AT3G57300	18	INO80	Encodes the Arabidopsis INO80 ortholog of the SWI/SNF ATPase family.
AT3G57470	17		Insulinase (Peptidase family M16) family protein.
AT3G57520	4	SIP2	SIP2 encodes a raffinose-specific alpha-galactosidase.
AT3G57550	1	AGK2	Guanylate kinase.
AT3G59390	3		Unknown protein.
AT3G59660	4		C2 domain-containing protein/GRAM domain-containing protein.
AT3G60510	1		ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein.
AT3G60810	4		Unknown protein
AT3G60840	3	MAP65-4	Encodes a non-motor microtubule associated protein (MAP).
AT3G61760	4	DL1B	FUNCTIONS IN: GTP binding, GTPase activity.
AT3G61990	4	OMTF3	Encodes a protein methyltransferase.
AT3G62830	4	AUD1	UDP-xylose feedback regulates several cell wall biosynthetic enzymes.
AT3G62900	6		CW-type Zinc Finger.
AT4G00700	1		C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein.
AT4G00930	7	CIP4.1	Encodes COP1-interacting protein CIP4.1.
AT4G00990	12		Transcription factor jumonji (jmc) domain-containing protein.
AT4G01550	4	NAC069	Encodes a plasma-membrane bound NAC transcription factor, whose controlled proteolytic activation allows it to enter the nucleus.
AT4G01990	1		Tetratricopeptide repeat (TPR)-like superfamily protein.
AT4G02780	2	GA1	Catalyzes the conversion of GGPP to CPP of gibberellin biosynthesis
AT4G03550	3	GSL05	Encodes a callose synthase that is required for wound and papillary callose formation in response to fungal pathogens Erysiphe and Blumeria.
AT4G04320	10		Malonyl-CoA decarboxylase family protein.
AT4G04910	18	NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor
AT4G05520	4	EHD2	Encodes one of the Arabidopsis Eps15 homology domain proteins.
AT4G08630	2		Unknown protein.
AT4G11390	2		Cysteine/Histidine-rich C1 domain family protein
AT4G11560	3, 4		Bromo-adjacent homology (BAH) domain-containing protein.
AT4G12680	2		Unknown protein.
AT4G13090	3	XTH2	Involved in carbohydrate metabolic process, cellular glucan metabolic process
AT4G13240	6	ROPGEF9	Encodes a member of KPP-like gene family.
AT4G13610	12	MEE57	INVOLVED IN: DNA methylation, embryo development.
AT4G13800	2		Protein of unknown function (DUF803).
AT4G14290	4		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT4G14365	9	XBAT34	FUNCTIONS IN: zinc ion binding.
AT4G14640	1	CAM8	Encodes a divergent member of calmodulin.
AT4G14716	6	ARD1	Encodes an acireductone dioxygenase.
AT4G14920	3		Acyl-CoA N-acyltransferase with RING/FYVE/PHD-type zinc finger protein.
AT4G15475	2		F-box/RNI-like superfamily protein.
AT4G16560	11		HSP20-like chaperone.
AT4G16630	16		DEA(D/H)-box RNA helicase family protein.
AT4G17970	3	ALMT12	Anion transporter involved in stomatal closure.
AT4G19880	3		Glutathione S-transferase family protein.
AT4G20010	4	PTAC9	FUNCTIONS IN: single-stranded DNA binding
AT4G21326	2	SBT3.12	FUNCTIONS IN: serine-type endopeptidase activity.
AT4G21470	4	FMN/FHY	Bifunctional enzyme that catalyzes hydrolysis of FMN to riboflavin, and phosphorylation of riboflavin to FMN.
AT4G22120	4		ERD (early-responsive to dehydration stress) family protein
AT4G23050	7		PAS domain-containing protein tyrosine kinase family protein.
AT4G23090	3		Unknown protein.
AT4G23220	4	CRK14	Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase.
AT4G23230	3	CRK15	Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT4G23350	4		Protein of Unknown Function (DUF239).
AT4G25290	1		DNA photolyases; DNA photolyases.
AT4G25500	3	RS40	Encodes an arginine/serine-rich splicing factor.
AT4G27370	6	VIIIB	Member of Myosin-like proteins.
AT4G27440	3	PORB	Light-dependent NADPH: protochlorophyllide oxidoreductaseB
AT4G27490	1		3'-5'-exoribonuclease family protein.
AT4G27890	1		HSP20-like chaperones superfamily protein.
AT4G28450	12		This gene is predicted to encode a protein with a DWD motif. 4
AT4G28950	5	ROP9	A member of ROP GTPase gene family.
AT4G29900	9	ACA10	One of the type IIB calcium pump isoforms.
AT4G31230	3		Protein kinase with adenine nucleotide alpha hydrolases-like domain.
AT4G31900	24	PKR2	INVOLVED IN: chromatin assembly or disassembly.
AT4G32050	16		Neurochondrin family protein.
AT4G32180	16	PANK2	Encodes a protein with pantothenate kinase activity.
AT4G32320	9	APX6	Encodes a cytosolic ascorbate peroxidase APX6.
AT4G32500	6	KT5	Encodes AKT5, a member of the Shaker family potassium ion (K+) channel.
AT4G32660	10	AME3	Encodes protein kinase AME3.
AT4G32840	1	PFK6	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Phosphofructokinase
AT4G33090	3	APM1	Encodes an aminopeptidase, a ortholog of mouse microsomal AP.
AT4G33210	1	SLOMO	Encodes a F-box protein required for auxin homeostasis and normal timing of lateral organ initiation at the shoot meristem.
AT4G35000	5	APX3	Encodes a microsomal ascorbate peroxidase APX3.
AT4G35580	5	NLT9	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: No apical meristem (NAM) protein.
AT4G36000	2		Pathogenesis-related thaumatin superfamily protein
AT4G36080	25		Phosphotransferase.
AT4G36280	8		Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase family protein.
AT4G37190	1		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Beta tubulin.
AT4G37370	2	CYP81D8	CYTOCHROME P450, FAMILY 81, SUBFAMILY D, POLYPEPTIDE 8.
AT4G37640	4	ACA2	Calmodulin-regulated Ca(2+)-pump located in the endoplasmic reticulum.
AT4G38170	1	FRS9	INVOLVED IN: response to red or far red light.
AT4G38470	7	STY46	ACT-like protein tyrosine kinase family protein.
AT4G38510	2		ATPase, V1 complex, subunit B protein.
AT4G39680	2		SAP domain-containing protein.
AT4G39970	4		Haloacid dehalogenase-like hydrolase (HAD) superfamily protein.
AT4G40010	4	SNRK2.7	Encodes a member of SNF1-related protein kinases (SnRK2).
AT5G01990	6		Auxin efflux carrier family protein.
AT5G02040	6	PRA1.A1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Prenylated rab acceptor PRA1.
AT5G03160	7	P58IPK	J domain protein localized in ER lumen.
AT5G03620	3		Subtilisin-like serine endopeptidase family protein.
AT5G05510	3		Mad3/BUB1 homology region 1.
AT5G05540	10	SDN2	FUNCTIONS IN: exonuclease activity, nucleic acid binding.
AT5G06080	1	LBD33	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Lateral organ boundaries, LOB.
AT5G06960	6	OBF5	Encodes a basic leucine zipper (B-ZIP) containing protein.
AT5G09550	9		GDP dissociation inhibitor family protein / Rab GTPase activator family protein.
AT5G10370	3		Helicase domain-containing protein / IBR domain-containing protein / zinc finger protein-related.
AT5G10630	9		Translation elongation factor EF1A/initiation factor IF2 gamma family protein.
AT5G10790	2	UBP22	Encodes a ubiquitin-specific protease.
AT5G10800	10		RNA recognition motif (RRM)-containing protein.
AT5G10940	10, 11	ASG2	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein.
AT5G11470	1		Bromo-adjacent homology (BAH) domain-containing protein.
AT5G11920	5	cwINV6	Encodes a protein with fructan exohydrolase (FEH) activity.
AT5G12370	19	SEC10	INVOLVED IN: exocytosis, vesicle docking.
AT5G12930	2		Unknown protein.
AT5G15700	3		Nucleus encoded plastid RNA polymerase.
AT5G15860	2	PCME	Encodes a protein with prenylcysteine methyltransferase activity.
AT5G16830	5	SYP21	Member of SYP2 Gene Family.
AT5G16880	2		Target of Myb protein 1.
AT5G17020	27	XPO1A	Involved with development of the male and female gametophytes.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT5G17060	6	ARFB1B	A member of ARF GTPase family.
AT5G17140	1		Cysteine proteinases superfamily protein.
AT5G17320	2	HDG9	Encodes a homeobox-leucine zipper family protein.
AT5G17390	2		Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein.
AT5G18210	2		NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein.
AT5G18440	6	NUFIP	Encodes NUFIP that directs assembly of C/D snoRNP.
AT5G18620	4	CHR17	INVOLVED IN: ATP-dependent chromatin remodeling.
AT5G19300	4		Protein of unknown function DUF171.
AT5G19830	5		Peptidyl-tRNA hydrolase family protein.
AT5G20660	5		Zn-dependent exopeptidases superfamily protein.
AT5G20680	6	TBL16	Encodes a member of the TBL gene family.
AT5G22590	1		Leucine Rich Repeat protein family.
AT5G23212	1		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT5G23240	1		DNA J heat shock N-terminal domain-containing protein.
AT5G23430	9		Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein.
AT5G24740	41		INVOLVED IN: protein localization.
AT5G24810	14		ABC1 family protein.
AT5G26760	3		Unknown protein.
AT5G26860	5	LON1	Encodes a member of the Lon protease-like proteins.
AT5G26920	4	CBP60G	Encodes a calmodulin-binding protein.
AT5G28730	1		Unknown protein.
AT5G30500	2	GolS10	Nucleotide-diphospho-sugar transferases superfamily protein.
AT5G33280	4		Voltage-gated chloride channel family protein.
AT5G36260	7		Eukaryotic aspartyl protease family protein.
AT5G37260	1	RVE2	Encodes a MYB transcription factor CIR1. Involved in circadian regulation.
AT5G38600	8		Proline-rich spliceosome-associated (PSP) family protein/zinc knuckle (CCHC-type) family protein.
AT5G39770	25		Represents a non-function pseudogene homologous to AtMSU81.
AT5G39790	3		Encodes a chloroplast localized protein with starch binding activity that may be involved in carbohydrate metabolism.
AT5G41110	2		Unknown protein.
AT5G41120	12		Esterase/lipase/thioesterase family protein.
AT5G41580	9		RING/U-box superfamily protein.
AT5G42370	6		Calcineurin-like metallo-phosphoesterase superfamily protein.
AT5G43230	4		Unknown protein.
AT5G43745	6		Protein of unknown function (DUF1012).
AT5G44010	5		Unknown protein.
AT5G44070	4	CAD1	Phytochelatins synthase gene confers tolerance to cadmium ions.
AT5G45300	1	BMV2	Encodes a beta-amylase-like protein present in the nucleus.
AT5G48770	2		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRRclass) family.
AT5G49020	3	PRMT4A	Encodes a type I protein arginine methyltransferase. The double mutants flower late due to defects in the autonomous pathway.
AT5G49030	4	OVA2	INVOLVED IN: tRNA aminoacylation for protein translation, ovule development.
AT5G49160	4	MET1	Encodes a cytosine methyltransferase MET1.
AT5G49190	10	SUS2	Mutant revealed a deficiency in sucrose synthase activity after flowering.
AT5G49220	4		Protein of unknown function (DUF789).
AT5G50320	2	ELO3	A subunit of Elongator. Three <i>A. thaliana</i> genes, encoding homologs of the yeast Elongator subunits are responsible for the narrow leaf phenotype in elongata mutants and for reduced root growth.
AT5G51570	1		SPFH/Band7/PHB domain-containing membrane-associated protein family.
AT5G53620	2		Unknown protein.
AT5G55660	4,5		DEK domain-containing chromatin associated protein.
AT5G55920	15	OLI2	Involved in ribosome biogenesis. Plays a role on organ size control by promoting cell proliferation and preventing compensation. in normal leaf development.
AT5G56350	2		Pyruvate kinase family protein.
AT5G56680	4	SYNC1	Encodes a putative cytosolic asparaginyl-tRNA synthetase.
AT5G56850	5		Unknown protein.
AT5G57350	12	HA3	Member of Plasma membrane H ⁺ -ATPase family.
AT5G57380	2	VIN3	Part of a large protein complex that has a role in establishing FLC repression during vernalization.

TAIR ID	Intron	Nombre	Descripción
AT5G57770	6, 7		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF828.
AT5G58600	2	PMR5	7 Involved in resistance to the powdery mildew.
AT5G60100	2	PRR3	PRR3 affects the period of the circadian clock.
AT5G60340	5		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT5G60350	1		Unknown protein.
AT5G60580	8		RING/U-box superfamily protein.
AT5G60840	1		Unknown protein.
AT5G61100	2		BEST <i>Arabidopsis thaliana</i> protein match is: zinc ion binding (AT5G61110).
AT5G61190	2		Putative endonuclease or glycosyl hydrolase.
AT5G61700	6	ABCA12	Member of ATH subfamily.
AT5G61900	1	BON1	Double mutants show defects in development that are genetically separable from hypersensitive/cell death response.
AT5G61910	1		DCD (Development and Cell Death) domain protein.
AT5G61980	4	AGD1	A member of ARF GAP domain (AGD).
AT5G62230	6	ERL1	Together with ER and ERL2 governs the initial decision of protodermal cells to either divide proliferatively or asymmetrically.
AT5G62310	12	IRE	Encodes a protein with a serine/threonine kinase domain. Knock-out mutation results in incomplete root hair elongation.
AT5G62410	19	SMC2	STRUCTURAL MAINTENANCE OF CHROMOSOMES 2
AT5G64080	2	XYP1	Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein.
AT5G64420	3		DNA polymerase V family.
AT5G66270	2		Zinc finger C-x8-C-x5-C-x3-H type family protein.
AT5G66420	4		LOCATED IN: cellular _component unknown.
AT5G66840	7		SAP domain-containing protein.
AT5G66930	5		Unknown protein.

Tabla III. Genes con la expresión más alta o más baja en el mutante *lsm8-1* en condiciones control

Genes con mayor o menor señal de hibridación en el mutante *lsm8-1* que en el WT. Los genes implicados en procesos de desarrollo están marcados en negrita.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
ALTOS			
AT1G02490	1,17		Unknown protein.
AT1G03660	2,52		Ankyrin-repeat containing protein.
AT1G13470	1,21		Protein of unknown function (DUF1262).
AT1G21250	1,45	WAK1	Cell wall-associated kinase.
AT1G32870	1,27	NAC13	No apical meristem (NAM) protein.
AT1G35710	2,68		Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain.
AT1G52857	1,82		Unknown protein.
AT1G59870	1,25	PEN3	ATP binding cassette transporter.
AT1G60985	1,22	SCRL6	Encodes a member of a family of small, secreted, cysteine rich proteins.
AT1G62863	2,51		Unknown protein.
AT1G75040	2,06	PR5	Thaumatococcus-like protein involved in response to pathogens.
AT2G04050	2,49		MATE efflux family protein.
AT2G04070	1,70		MATE efflux family protein.
AT2G14560	1,68	LURP1	LURP1 is required for full basal defense to <i>H. parasitica</i> .
AT2G14610	2,47	PR1	PR1 gene expression is induced in response to a variety of pathogens.
AT2G15080	1,13	RLP19	INVOLVED IN: signal transduction, defense response.
AT2G18193	2,14		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT2G21640	1,40		Encodes a protein of unknown function that is a marker for oxidative stress response.
AT2G29870	1,14		Aquaporin-like superfamily protein.
AT2G30250	1,16	WRKY25	Transcription Factor. Involved in response to various abiotic stresses.
AT2G30766	1,08		Unknown protein.
AT2G31880	1,86	SOBIR1	Encodes a putative leucine rich repeat transmembrane protein.
AT2G32680	1,60	RLP23	INVOLVED IN: signal transduction, defense response.
AT2G40995	1,19		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT2G41100	0,99	TCH3	Encodes a calmodulin-like protein.
AT2G41730	3,98		Unknown protein.
AT2G42270	1,06		U5 small nuclear ribonucleoprotein helicase.
AT2G43745	1,54		BEST A. <i>thaliana</i> protein match is: Mannose-binding lectin superfamily protein.
AT2G47000	1,09	ABCB4	Functions in the basipetal redirection of auxin from the root tip.
AT3G11010	1,55	RLP34	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Leucine-rich repeat.
AT3G12545	1,27		Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein.
AT3G13080	2,60	ABCC3	Encodes an ATP-dependent MRP-like ABC transporter.
AT3G22370	3,00	AOX1A	Plays a role in shoot acclimation to low temperature. Also is capable of ameliorating reactive oxygen species production when the cytochrome pathway is inhibited.
AT3G26930	1,38		Protein with RNI-like/FBD-like domains
AT3G28243	3,07		Unknown protein.
AT3G28540	1,97		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT3G50930	2,08	BCS1	FUNCTIONS IN: nucleoside-triphosphatase activity, ATPase activity.
AT3G57250	1,56		Emsy N Terminus (ENT) domain-containing protein.
AT3G57260	2,07	BGL2	beta 1,3-glucanase
AT3G59450	1,03		Calcium-binding EF-hand family protein.
AT4G08850	1,02		Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein.
AT4G10457	1,05	SCRL1	Encodes a member of a family of small, secreted, cysteine rich proteins.
AT4G10500	1,45		2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein.
AT4G12735	2,86		Unknown protein.
AT4G13810	1,38	RLP47	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Leucine-rich repeat-containing N-terminal domain, type 2.
AT4G14225	1,02		A20/AN1-like zinc finger family protein.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
AT4G14400	1,30	ACD6	The gene is involved in resistance to <i>Pseudomonas syringae</i> .
AT4G15735	1,14	SCRL10	Encodes a member of a family of small, secreted, cysteine rich proteins.
AT4G16451	2,85		This gene encodes a small protein.
AT4G23140	1,20	CRK6	<i>Arabidopsis thaliana</i> receptor-like protein kinase.
AT4G28005	1,16		BEST <i>A. thaliana</i> protein match is: NADH-ubiquinone oxidoreductase-related.
AT4G37235	1,21		Uncharacterised protein family (UPF0497).
AT4G39090	1,07	RD19	Similar to cysteine proteinases, induced by desiccation but not ABA.
AT5G02021	4,62		This gene encodes a small protein.
AT5G10760	2,59		Eukaryotic aspartyl protease family protein.
AT5G13210	3,19		Uncharacterised conserved protein UCP015417.
AT5G16023	1,50	RTFL18	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: DVL (InterPro:IPR012552).
AT5G20150	1,15	SPX1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: SPX, N-terminal (InterPro:IPR004331).
AT5G24530	1,62	DMR6	Encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase that is defense-associated.
AT5G24640	1,56		Unknown protein.
AT5G25250	1,42		SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family.
AT5G28540	1,03	BIP1	Encodes the luminal binding protein BiP.
AT5G43450	1,21		encodes a protein whose sequence is similar to ACC oxidase
AT5G50361	2,40		Unknown protein.
AT5G51440	1,48		HSP20-like chaperones superfamily protein.
BAJOS			
AT1G01180	-1,08		S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein.
AT1G01430	-1,09	TBL25	Encodes a member of the TBL gene family.
AT1G01725	-1,66		Unknown protein.
AT1G02820	-1,07		Late embryogenesis abundant 3 (LEA3) family protein.
AT1G04000	-1,21		Unknown protein.
AT1G04350	-1,39		Encodes a protein similar to 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase
AT1G06360	-1,01		Fatty acid desaturase family protein.
AT1G07720	-1,35	KCS3	Encodes a member of the 3-ketoacyl-CoA synthase family.
AT1G09645	-1,13		Unknown protein.
AT1G10360	-1,06	GSTU18	Encodes glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs.
AT1G10740	-1,12		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT1G13390	-1,35		Unknown protein.
AT1G14200	-1,73		RING/U-box superfamily protein.
AT1G14700	-1,19	PAP3	FUNCTIONS IN: protein serine/threonine phosphatase activity.
AT1G15260	-1,11		Unknown protein.
AT1G15400	-2,68		Unknown protein.
AT1G16920	-1,01	RABA1b	Small GTP-binding protein (Rab11)similar to YPT3/RAB11 proteins in yeast.
AT1G17620	-1,01		Late embryogenesis abundant hydroxyproline-rich glycoprotein family.
AT1G19550	-1,34		Glutathione S-transferase family protein.
AT1G19670	-1,41	CLH1	Chlorophyllase is the first enzyme involved in chlorophyll degradation.
AT1G20330	-1,54	SMT2	Encodes a sterol-C24-methyltransferases. Mutants display serrated petals and sepals and altered cotyledon vascular patterning.
AT1G20650	-1,15	ASG5	Protein kinase superfamily protein.
AT1G24170	-1,50	LGT9	Encodes a protein with putative galacturonosyltransferase activity.
AT1G24735	-1,62		S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein.
AT1G28140	-1,25		Unknown protein.
AT1G30260	-1,76		BEST <i>A. thaliana</i> protein match is: Galactosyltransferase family protein.
AT1G35242	-3,40		Unknown protein.
AT1G43950	-1,20	ARF23	BEST <i>A. thaliana</i> protein match is: auxin response factor 12.
AT1G49715	-1,32		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT1G50530	-1,94		BEST <i>A. thaliana</i> protein match is: Calcium-dependent lipid-binding family protein.
AT1G52590	-1,06		Putative thiol-disulphide oxidoreductase DCC.
AT1G52618	-1,76		Unknown protein.
AT1G53870	-1,38		Protein of unknown function (DUF567).
AT1G57610	-1,83		Protein of unknown function (DUF607).
AT1G60815	-2,89	RALFL7	Rapid alkalinization factor (RALF) family protein.
AT1G62250	-1,41		Unknown protein.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
AT1G64390	-1,12	GH9C2	FUNCTIONS IN: carbohydrate binding, hydrolase activity.
AT1G64770	-1,53	PnsB2	Encodes a subunit of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex.
AT1G65295	-1,18		Unknown protein.
AT1G66100	-1,63		Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) protein.
AT1G68840	-1,06	RAV2	Involved in negative regulation of transcription.
AT1G68945	-1,36		Unknown protein.
AT1G70890	-1,36	MLP43	INVOLVED IN: response to biotic stimulus, defense response.
AT1G73580	-1,53		Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein.
AT1G73600	-1,22		S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein.
AT1G78170	-2,13		Unknown protein.
AT1G78850	-1,14		curculin-like (mannose-binding) lectin family protein.
AT2G04039	-1,37		Unknown protein.
AT2G05540	-1,69		Glycine-rich protein family.
AT2G15050	-1,22	LTP	Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) protein.
AT2G15620	-1,03	NIR1	Involved in the second step of nitrate assimilation.
AT2G17300	-2,87		Unknown protein.
AT2G19820	-1,40	LBD9	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Lateral organ boundaries, LOB.
AT2G20875	-1,58	EPF1	Encodes a secretory peptide involved in stomatal development.
AT2G21210	-1,50		Putative auxin-regulated protein.
AT2G23430	-1,16	ICK1	Encodes a cyclin-dependent kinase inhibitor protein that functions as a negative regulator of cell division and promoter of endoreduplication.
AT2G25250	-1,16		Unknown protein.
AT2G26695	-1,45		Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein.
AT2G27385	-1,43		Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein.
AT2G27930	-1,27		PLATZ transcription factor family protein.
AT2G29320	-1,08		NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein.
AT2G29360	-1,21		NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein.
AT2G30230	-1,28		Unknown protein.
AT2G30925	-1,40		Unknown protein.
AT2G32100	-1,30	OFP16	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF623.
AT2G32960	-1,36	PFA-DSP2	Encodes an atypical dual-specificity phosphatase.
AT2G33380	-1,03	RD20	Encodes a calcium binding protein.
AT2G34585	-1,39		Unknown protein.
AT2G35700	-1,56	ERF38	Encodes a transcription factor. Thought to be involved in secondary cell wall metabolism.
AT2G36916	-1,77		Unknown protein.
AT2G38140	-1,65	PSRP4	Plastid-specific ribosomal protein 4 (PSRP4) mRNA, complete
AT2G39310	-1,01	JAL22	FUNCTIONS IN: molecular function unknown.
AT2G39450	-1,85	MTP11	Encodes a Golgi-localized manganese transporter.
AT2G41420	-1,13	WIH2	Proline-rich family protein.
AT2G42190	-1,26		Unknown protein.
AT2G42540	-1,57	COR15A	A cold-regulated gene whose product is targeted to the chloroplast.
AT2G43530	-1,73		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT2G45180	-1,18		Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein.
AT2G45200	-1,12	GOS12	Encodes a member of the GOS1 (Golgi SNARE) gene family.
AT2G47930	-1,40	AGP26	Arabinogalactan protein 26
AT3G02730	-1,02	TRXF1	INVOLVED IN: positive regulation of catalytic activity.
AT3G13520	-1,12	AGP12	Encodes a GPI-anchored arabinogalactan (AG) peptide.
AT3G13845	-1,83		Unknown protein.
AT3G14110	-1,40	FLU	Encodes a coiled-coil, TPR domain containing protein that is involved in chlorophyll biosynthesis.
AT3G14981	-1,71		Unknown protein.
AT3G15530	-1,74		S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein.
AT3G16570	-1,21	RALF23	Mature overexpressing plants are shorter and bushier.
AT3G17120	-1,01		Unknown protein.
AT3G20320	-1,05	ABC115	Encodes a permease-like component of an ABC transporter.
AT3G20470	-1,12	GRP5	Encodes a glycine-rich protein.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
AT3G23810	-1,32	SAHH2	INVOLVED IN: one-carbon metabolic process.
AT3G24420	-1,00		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT3G25717	-1,53	RTFL16	INVOLVED IN: shoot development.
AT3G26510	-1,05		Octicosaepptide/Phox/Bem1p family protein.
AT3G27030	-1,32		Unknown protein.
AT3G28080	-1,44		Nodulin MtN21 /EamA-like transporter family protein.
AT3G28220	-1,18		TRAF-like family protein.
AT3G29030	-1,04	EXPA5	Encodes an expansin.
AT3G29036	-2,41		Unknown protein.
AT3G42570	-1,11		peroxidase family protein.
AT3G44260	-1,53	CAF1a	Encodes one of the homologs of the yeast CCR4-associated factor 1.
AT3G44735	-1,60	PSK3	Phytosulfokine 3 precursor, coding for a unique plant peptide growth factor.
AT3G44990	-1,24	XTR8	xyloglucan endo-transglycosylase
AT3G46130	-1,38	MYB48	Encodes a putative transcription factor.
AT3G48720	-1,01		HXXXD-type acyl-transferase family protein.
AT3G50440	-1,44	MES10	Encodes a protein shown to have methyl jasmonate esterase activity in vitro.
AT3G50560	-1,10		NAD(P)-binding Rossmann-fold superfamily protein.
AT3G52370	-1,36	FLA15	INVOLVED IN: cell adhesion.
AT3G52560	-1,03	UEV1D-4	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Ubiquitin-conjugating enzyme, E2.
AT3G53730	-1,38		Histone superfamily protein.
AT3G54690	-1,03	SETH3	Sugar isomerase (SIS) family protein.
AT3G55250	-1,07	PDE329	Unknown protein.
AT3G55360	-1,12	CER10	Mutants in this gene show abnormal organ morphology. Cells in all tissues are only about 1/3 of the size of wild type cells.
AT3G56250	-1,07		Unknown protein.
AT3G57020	-1,35		Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein.
AT4G00165	-1,01		Bifunctional inhibitor/lipid-transfer protein/seed storage 2S albumin superfamily protein.
AT4G00360	-1,73	CYP86A2	Encodes a member of the CYP86A subfamily of cytochrome p450 genes.
AT4G02530	-1,18		Chloroplast thylakoid lumen protein.
AT4G02850	-1,12		Phenazine biosynthesis PhzC/PhzF family protein.
AT4G08870	-1,08		Encodes one of the two arginase in the genome.
AT4G09012	-1,60		Mitochondrial ribosomal protein L27
AT4G09860	-2,41		Unknown protein.
AT4G10080	-1,01		Unknown protein.
AT4G12730	-1,03	FLA2	<i>A. thaliana</i> fasciclin-like arabinogalactan-protein 2 (Fla2).
AT4G12880	-1,18	ENODL19	FUNCTIONS IN: electron carrier activity, copper ion binding.
AT4G12980	-1,25		Auxin-responsive family protein.
AT4G13570	-1,51	HTA4	Encodes HTA4, a histone H2A protein.
AT4G13575	-1,63		Unknown protein.
AT4G14010	-1,13	RALFL32	Member of a diversely expressed predicted peptide family.
AT4G15630	-1,43		Uncharacterised protein family (UPF0497).
AT4G16500	-1,76		Cystatin/monellin superfamily protein.
AT4G17340	-1,25	TIP2;2	INVOLVED IN: response to salt stress, transport.
AT4G17695	-1,01	KAN3	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Homeodomain-like, Myb, DNA-binding.
AT4G18070	-1,16		Unknown protein.
AT4G19035	-2,37	LCR7	Encodes a member of a family of small,secreted, cysteine rich protein.
AT4G23670	-1,72		Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein.
AT4G24570	-2,06	DIC2	Encodes one of the mitochondrial dicarboxylate carriers (DIC).
AT4G24920	-1,15		secE/sec61-gamma protein transport protein.
AT4G25700	-1,47	BETA-OHASE 1	Converts beta-carotene to zeaxanthin via cryptoxanthin.
AT4G26790	-1,25		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein.
AT4G27280	-1,54		Calcium-binding EF-hand family protein.
AT4G28730	-1,76	GrxC5	Encodes a glutaredoxin GrxC5.
AT4G29905	-1,57		Unknown protein.
AT4G30270	-1,05	MERIS	Encodes a protein similar to endo xyloglucan transferase. It is also very similar to BRU1 in soybean, which is involved in brassinosteroid response.
AT4G30400	-1,12		RING/U-box superfamily protein.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
AT4G30650	-1,57		Low temperature and salt responsive protein family.
AT4G30760	-1,74		Putative endonuclease or glycosyl hydrolase.
AT4G32570	-1,06	TIFY8	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Tify (InterPro:IPR010399).
AT4G35320	-1,36		Unknown protein.
AT4G37800	-1,56	XTH7	FUNCTIONS IN: hydrolase activity, acting on glycosyl bonds.
AT4G39710	-1,15	PnsL4	FUNCTIONS IN: FK506 binding, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity;
AT4G40060	-1,32	HB16	Encodes a homeodomain leucine zipper class I (HD-Zip I) protein.
AT5G01350	-1,11		Unknown protein.
AT5G02380	-1,40	MT2B	cysteine-rich protein with copper-binding activity
AT5G04045	-1,09		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT5G04900	-1,00	NOL	Encodes a chlorophyll b reductase involved in the degradation of chlorophyll b and LHCII (light harvesting complex II).
AT5G09850	-1,08		Transcription elongation factor (TFIIS) family protein.
AT5G14410	-1,03		Unknown protein.
AT5G16010	-1,01		3-oxo-5-alpha-steroid 4-dehydrogenase family protein.
AT5G16650	-1,15		Chaperone DnaJ-domain superfamily protein.
AT5G18030	-1,27		SAUR-like auxin-responsive protein family.
AT5G18050	-2,13		SAUR-like auxin-responsive protein family.
AT5G21100	-1,40		Plant L-ascorbate oxidase.
AT5G22360	-1,03	VAMP714	Member of Synaptobrevin-like AtVAMP7C, v-SNARE protein family.
AT5G22440	-1,05		Ribosomal protein L1p/L10e family.
AT5G23760	-1,24		Copper transport protein family.
AT5G23920	-1,17		Unknown protein.
AT5G25090	-1,93	ENODL13	FUNCTIONS IN: electron carrier activity, copper ion binding.
AT5G25450	-1,00		Cytochrome bd ubiquinol oxidase, 14kDa subunit.
AT5G35490	-2,40	MRU1	Encodes MRU1 (mto 1 responding up).
AT5G37770	-1,19	TCH2	Encodes a protein with 40% similarity to calmodulin.
AT5G38060	-1,29		Unknown protein.
AT5G40960	-3,89		Protein of unknown function (DUF 3339).
AT5G41050	-1,13		Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein.
AT5G42650	-1,49	AOS	Encodes a member of the cytochrome p450 CYP74 gene family.
AT5G44130	-1,05	FLA13	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown.
AT5G45130	-1,02	RHA1	small GTP binding protein
AT5G45940	-1,02	NUDT11	Encodes a CoA pyrophosphatase. Over-expression mutant had a bigger plant with wider rosette.
AT5G46690	-1,60	bHLH071	FUNCTIONS IN: sequence-specific DNA binding transcription factor activity.
AT5G48860	-1,46		Unknown protein.
AT5G49740	-1,21	FRO7	Encodes a chloroplast ferric chelate reductase.
AT5G50950	-1,12	FUM2	Encodes a fumarase enzyme.
AT5G51720	-1,27		2 iron, 2 sulfur cluster binding.
AT5G52600	-1,56	MYB82	Member of the R2R3 factor gene family.
AT5G57760	-1,18		Unknown protein.
AT5G58770	-1,15		Undecaprenyl pyrophosphate synthetase family protein.
AT5G61640	-1,29	PMSR1	ubiquitous enzyme that repairs oxidatively damaged proteins
AT5G64620	-1,10	C/VIF2	Plant cell wall (CWI) and vacuolar invertases (VI).
AT5G64890	-2,37	PROPEP2	BEST <i>A. thaliana</i> protein match is: precursor of peptide 1.
AT5G65683	-1,35		Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein.
AT5G65730	-1,97	XTH6	FUNCTIONS IN: hydrolase activity, acting on glycosyl bonds.
AT5G66211	-1,39		This gene encodes a small protein.
AT5G67420	-1,00	LBD37	Encodes a LOB-domain protein involved in nitrogen metabolism and affecting leaf morphogenesis.

Tabla IV. Intrones retenidos en el mutante *lsm8-1* tras la exposición a 4°C

Intrones con mayor señal de hibridación en el mutante *lsm8-1* que en el WT tras la exposición a 4°C durante 24 horas. Los genes regulados por frío están marcados en negrita.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT1G01020	6	ARV1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Arv1-like protein (InterPro:IPR729)
AT1G01160	2	GIF2	<i>A. thaliana</i> GRF1-interacting factor 2 (GIF2) mRNA
AT1G02080	26		Transcription regulators.
AT1G03280	6		Transcription factor TFIIIE, alpha subunit.
AT1G04600	19, 23	MYOSIN XI A	Member of Myosin-like proteins.
AT1G04620	9	HCAR	Encodes a 7-hydroxymethyl chlorophyll a reductase.
AT1G04730	1	CTF18	Necessary for sister chromatid cohesion. Acts in synergy with ETG1.
AT1G05670	1, 2		Pentatricopeptide repeat (PPR-like) superfamily protein.
AT1G05890	14	ARI5	FUNCTIONS IN: zinc ion binding.
AT1G06210	3		ENTH/VHS/GAT family protein.
AT1G06220	4	MEE5	Encodes a protein with similarity to splicing factor Snu114.
AT1G06590	13		Unknown protein.
AT1G06800	1	PLA-I{gamma}1	Hydrolyzes phosphatidylcholine, glycolipids as well as triacylglycerols.
AT1G06950	1	TIC11	Encodes a protein thought to be a part of the translocon at the chloroplast inner envelope. Involved in protein import into the chloroplast and chloroplast biogenesis.
AT1G07290	7	GONST2	Encodes a GDP-mannose transporter.
AT1G08130	14	LIG1	Encodes the Arabidopsis DNA ligase 1.
AT1G08420	1	BSL2	FUNCTIONS IN: hydrolase activity, manganese ion binding, protein serine/threonine phosphatase activity.
AT1G08490	5	CPNIFS	Chloroplastic Nifs-like protein.
AT1G09000	13	NP1	NPK1-related protein kinase 1S.
AT1G09060	6		Zinc finger, RING-type. Transcription factor.
AT1G09770	3	CDC5	Member of MYB3R- and R2R3- type MYB- encoding genes.
AT1G10130	27	ECA3	Encodes a golgi localized P2A-type Ca2+ ATPase.
AT1G10510	17	EMB24	INVOLVED IN: embryo development ending in seed dormancy.
AT1G10900	7		Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase family protein.
AT1G11310	3, 7	MLO2	Member of a family of seven-transmembrane domain proteins specific to plants.
AT1G11380	1		PLAC8 family protein
AT1G11420	5	DUF2	Member of the plant-specific DUF724 protein family.
AT1G13120	11		INVOLVED IN: embryo development ending in seed dormancy.
AT1G13750	4		Purple acid phosphatases superfamily protein.
AT1G14460	1		AAA-type ATPase family protein.
AT1G14830	11	DL1C	Encodes a dynamin-like protein.
AT1G14880	2	PCR1	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown.
AT1G15210	3	ABCG35	ATPase activity, coupled to transmembrane movement of substances.
AT1G15415	1		Encodes protein phosphatase 2A (PP2A) B'gamma subunit.
AT1G16220	4		Protein phosphatase 2C family protein.
AT1G17190	1	GSTU26	Encodes glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs.
AT1G17290	11	ALAAT1	Encodes for alanine aminotransferase.
AT1G17450	3		B-block binding subunit of TFIIC.
AT1G17580	17, 18	MYA1	Encodes a member of the type XI myosin protein family.
AT1G17760	6	CSTF77	Encodes a homolog of a mammalian polyadenylation factor subunit.
AT1G19530	2		Unknown protein.
AT1G19750	3		Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein.
AT1G20110	2, 4		RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein.
AT1G20770	2		Unknown protein.
AT1G20890	1		Unknown protein.
AT1G21080	5		DNAJ heat shock N-terminal domain-containing protein.
AT1G22570	3		Major facilitator superfamily protein.
AT1G22620	3	ATSAC1	SAC domain phosphoinositide (3,5)P2 phosphatase.
AT1G22670	1		Protease-associated (PA) RING/U-box zinc finger family protein.
AT1G23020	1	FRO3	Encodes a ferric chelate reductase whose transcription is regulated by FIT1.
AT1G23700	8		Protein kinase superfamily protein.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT1G24030	6		Protein kinase superfamily protein.
AT1G24320	6		Six-hairpin glycosidases superfamily protein.
AT1G26750	3		Unknown protein.
AT1G27750	2		Nucleic acid binding.
AT1G27910	3	PUB45	Encodes a protein containing a UND, a U-box, and an ARM domain.
AT1G29940	23	NRPA2	Encodes a subunit of RNA polymerase 1 (aka RNA polymerase A).
AT1G29990	2	PFD6	Encodes a protein with similarity to yeast subunit of the prefoldin complex.
AT1G30410	14	ABCC12	Member of MRP subfamily.
AT1G31970	2	STRS1	FUNCTIONS IN: helicase activity, ATP binding.
AT1G32070	6	NSI	Encodes a nuclear acetyltransferase.
AT1G32230	1, 4	RCD1	Encodes a protein belonging to the (ADP-ribosyl) transferase domain-containing subfamily of WWE protein-protein interaction domain protein family.
AT1G32490	12	ESP3	Encodes a homolog of the yeast PRP2 protein.
AT1G32730	2		Unknown protein.
AT1G32940	6	SBT3.5	FUNCTIONS IN: identical protein binding, serine-type endopeptidase activity.
AT1G32970	3		Subtilisin-like serine endopeptidase family protein.
AT1G33400	9	TPR9	Encodes one carboxylate clamp -tetratricopeptide repeat proteins.
AT1G33750	1		Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein.
AT1G34095	3		Unknown protein.
AT1G34380	2		5'-3' exonuclease family protein.
AT1G34630	2		BEST A. <i>thaliana</i> protein match is: Mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim17/Tim22/Tim23 family protein.
AT1G35250	2		Thioesterase superfamily protein.
AT1G45150	2		Unknown protein.
AT1G45332	9		Translation elongation factor EFG/EF2 protein.
AT1G47720	1	OSB1	Encodes an organellar single-strand DNA binding protein.
AT1G48260	4	CIPK17	Encodes a member of the SNF1-related kinase (SnRK) gene family.
AT1G48650	10		DEA(D/H)-box RNA helicase family protein.
AT1G48790	7	AMSH1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Mov34/MPN/PAD-1 (InterPro:IPR000555).
AT1G49160	6	WNK7	Encodes a member of the WNK family (9 members in all) of protein kinases.
AT1G49250	6		ATP-dependent DNA ligase.
AT1G49700	2		Plant protein 1589 of unknown function.
AT1G49850	1		RING/U-box superfamily protein.
AT1G50950	8		INVOLVED IN: cell redox homeostasis.
AT1G50970	8		Membrane trafficking VPS53 family protein.
AT1G51310	6		Transferases; tRNA (5-methylaminomethyl-2-thiouridylate)-methyltransferases.
AT1G51350	5		ARM repeat superfamily protein.
AT1G51490	8	BGLU36	FUNCTIONS IN: cation binding, INVOLVED IN: response to salt stress.
AT1G51520	1		RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein.
AT1G51740	4	SYP81	Member of SYP8 Gene Family
AT1G51870	5		Protein kinase family protein.
AT1G52450	1		Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related protein.
AT1G53430	2, 16		Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase.
AT1G54260	3		Winged-helix DNA-binding transcription factor family protein.
AT1G54680	3		Unknown protein..
AT1G55350	25	DEK1	Similar to maize DEK1, a gene encoding a membrane protein of the calpain gene superfamily.
AT1G55570	1	SKS12	FUNCTIONS IN: copper ion binding; INVOLVED IN: oxidation reduction.
AT1G60500	1	DRP4C	FUNCTIONS IN: GTP binding, GTPase activity.
AT1G61460	6		S-locus protein kinase, putative.
AT1G61667	1		Protein of unknown function, DUF538.
AT1G61670	3		Lung seven transmembrane receptor family protein.
AT1G62040	5	ATG8C	FUNCTIONS IN: microtubule binding; INVOLVED IN: autophagy
AT1G62320	10		ERD (early-responsive to dehydration stress) family protein.
AT1G62880	2		Cornichon family protein.
AT1G63490	6, 14, 11		Transcription factor jumonji (jmc) domain-containing protein.
AT1G63640	6		P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT1G64570	7	DUO3	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Homeodomain-like (InterPro:IPR009057).
AT1G64710	1		GroES-like zinc-binding dehydrogenase family protein.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT1G64790	29	ILA	HEAT repeat protein involved in plant immunity.
AT1G66200	1	GSR2	Encodes a cytosolic glutamate synthetase.
AT1G66760	5		MATE efflux family protein.
AT1G67140	4	SWEETIE	INVOLVED IN: trehalose metabolic process, starch metabolic process.
AT1G67320	16	EMB2813	DNA primase, large subunit family.
AT1G67420	16		Zn-dependent exopeptidases superfamily protein.
AT1G70790	1		Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein.
AT1G71790	7		Subunits of heterodimeric actin filament capping protein Capz superfamily.
AT1G72280	3	ERO1	Endoplasmic reticulum oxidoreductin
AT1G72416	4		Chaperone DnaJ-domain superfamily protein.
AT1G72560	5	PSD	Encodes a karyopherin, specifically the Arabidopsis ortholog of LOS1/XPOT.
AT1G73280	4	scpl3	FUNCTIONS IN: serine-type carboxypeptidase activity.
AT1G74020	2	SS2	Encodes AtSS-2 strictosidine synthase.
AT1G74340	1	DPMS2	Dolichol phosphate-mannose biosynthesis regulatory protein-related.
AT1G74710	5	EDS16	Encodes a protein with isochorismate synthase activity.
AT1G75700	3	HVA22G	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: TB2/DP1/HVA22 related protein.
AT1G76720	5		Eukaryotic translation initiation factor 2 (eIF-2) family protein.
AT1G77270	3		Unknown protein..
AT1G77300	14	EFS	Encodes a protein with histone lysine N-methyltransferase activity.
AT1G77690	1	LAX3	Encodes an auxin influx carrier that promotes lateral root emergence.
AT1G77770	2		FUNCTIONS IN: zinc ion binding.
AT1G78590	4	NADK3	Encodes a NADH kinase which can synthesize NADPH from NADH.
AT1G78620	2		Protein of unknown function DUF92, transmembrane.
AT1G80000	9		CASC3/Barentsz eIF4AIII binding.
AT1G80070	20	SUS2	Genetic locus involved in embryogenesis.
AT2G02570	8		Nucleic acid binding;RNA binding.
AT2G03070	12	MED8	Encodes a subunit of the Mediator complex.
AT2G04025	2	RGF3	Encodes a root meristem growth factor (RGF).
AT2G05260	3		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT2G05360	1		BEST A. <i>thaliana</i> protein match is: F-box associated ubiquitination effector family protein.
AT2G05752	4		Unknown protein.
AT2G06210	12	ELF8	Encodes a yeast CTR9 homolog that is involved in the control of flowering time.
AT2G07190	2		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Domain of unknown function DUF1985.
AT2G11626	2, 3		FUNCTIONS IN: molecular_function unknown.
AT2G13370	3	CHR5	FUNCTIONS IN: chromatin binding, helicase activity, DNA binding.
AT2G14050	14	MCM9	FUNCTIONS IN: DNA-dependent ATPase activity
AT2G16405	2		Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein.
AT2G16900	3		Arabidopsis phospholipase-like protein (PEARL1 4) family.
AT2G17620	1	CYCB2;1	FUNCTIONS IN: cyclin-dependent protein kinase regulator activity.
AT2G17700	1	STY8	ACT-like protein tyrosine kinase family protein.
AT2G17790	3, 14	VPS35A	Encodes a protein with similarity to a yeast component of the retromer.
AT2G17890	1	CPK16	Member of Calcium Dependent Protein Kinase.
AT2G19800	1	MIOX2	Encodes a myo-inositol oxygenase family gene.
AT2G19950	4	GC1	Predicted to encode a protein known as a golgin in mammals and yeast.
AT2G20410	2		RNA-binding ASCH domain protein.
AT2G20840	5	SCAMP3	Secretory carrier membrane protein (SCAMP) family protein.
AT2G22300	7	SR1	Encodes a putative CAM binding transcription factor.
AT2G22475	1	GEM	Encodes GL2-expression modulator.
AT2G22610	9		Di-glucose binding protein with Kinesin motor domain.
AT2G23000	3	scpl1	INVOLVED IN: proteolysis.
AT2G23550	1	MES6	Encodes a protein predicted to act as a carboxylesterase.
AT2G23890	12		HAD-superfamily hydrolase, subfamily IG, 5'-nucleotidase.
AT2G24120	2	SCA3	FUNCTIONS IN: DNA-directed RNA polymerase activity, protein binding.
AT2G24700	3		Transcriptional factor B3 family protein.
AT2G25170	13	PKL	Encodes a SWI/SWF nuclear-localized chromatin remodeling factor of the CHD3 group.
AT2G25470	2	RLP21	INVOLVED IN: signal transduction.
AT2G25540	6	CESA1	Cellulose synthase.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT2G25780	1		Protein of unknown function (DUF1677).
AT2G26000	9	BRIZ2	Encodes a RING domain containing protein BRIZ2.
AT2G27880	5	AGO5	FUNCTIONS IN: nucleic acid binding.
AT2G27990	3	BLH8	Encodes a BEL1-like homeobox gene.
AT2G28310	4		Protein of unknown function (DUF707).
AT2G28360	18		SIT4 phosphatase-associated family protein.
AT2G28390	11		SAND family protein.
AT2G28520	4	VHA-A1	Vacuolar proton ATPase subunit VHA-a isoform 1.
AT2G28830	2	PUB12	Encodes a U-box E3 ubiquitin ligase.
AT2G28990	11		Leucine-rich repeat protein kinase family protein.
AT2G29890	5	VLN1	Encodes a ubiquitously expressed villin-like protein.
AT2G30480	7		Unknown protein.
AT2G30520	2	RPT2	Signal transducer of the phototropic response in Arabidopsis.
AT2G31450	9	ATNTH1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Helix-hairpin-helix DNA-binding motif.
AT2G31510	6	ARI7	FUNCTIONS IN: zinc ion binding, nucleic acid binding.
AT2G31810	10		ACT domain-containing small subunit of acetolactate synthase protein.
AT2G31960	20	GSL3	Encodes a protein similar to callose synthase.
AT2G31970	14	RAD5	Encodes the Arabidopsis RAD50 homologue.
AT2G32160	10		S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein.
AT2G32430	10		Galactosyltransferase family protein.
AT2G32620	8	CSLB2	Encodes a gene similar to cellulose synthase.
AT2G32860	6	BGLU33	FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity.
AT2G33210	7	HSP6-2	INVOLVED IN: inflammatory response, response to salt stress.
AT2G33240	32	XID	Member of Myosin-like proteins.
AT2G33470	1	GLTP1	FUNCTIONS IN: glycolipid transporter activity, glycolipid binding.
AT2G34660	23	ABCC2	Encodes a multidrug resistance-associated protein.
AT2G34830	2	WRKY35	Member of WRKY Transcription Factor; Group II-e.
AT2G35950	1	EDA12	Embryo sac development arrest 12.
AT2G36355	1		Family of unknown function (DUF662).
AT2G36680	6		Modifier of rudimentary (Mod(r)) protein.
AT2G36970	1		UDP-Glycosyltransferase superfamily protein.
AT2G37370	13		Unknown protein.
AT2G38020	15	VCL1	Necessary for proper vacuole formation and morphogenesis in Arabidopsis.
AT2G38060	3, 4	PHT4;2	Encodes an inorganic phosphate transporter (PHT4;2).
AT2G38840	2		Guanylate-binding family protein.
AT2G39040	2		Peroxidase superfamily protein.
AT2G39260	4		Binding; RNA binding.
AT2G39820	1	eIF6B	Translation initiation factor IF6.
AT2G39855	3		Unknown protein.
AT2G41680	5	NTRC	Encodes a NADPH thioredoxin reductase involved in chloroplast protection against oxidative damage.
AT2G41790	16		Insulinase (Peptidase family M16) family protein.
AT2G42010	6	PLDBETA1	Phospholipase D (PLDbeta)
AT2G42120	12	POLD2	DNA polymerase delta small subunit (POLD2).
AT2G42860	1		Unknown protein.
AT2G44270	5	ROL5	Encodes ROL5, a repressor of lrx1 mutants that develop aberrant root hairs.
AT2G44470	2	BGLU29	FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity.
AT2G44930	3		Plant protein of unknown function (DUF247).
AT2G45170	3	ATG8E	Involved in autophagy.
AT2G45460	11		SMAD/FHA domain-containing protein.
AT2G45580	3	CYP76C3	Member of CYP76C.
AT2G45730	6		Eukaryotic initiation factor 3 gamma subunit family protein.
AT2G46180	1	GC4	Predicted to encode a protein known as a golgin in mammals and yeast.
AT2G47220	9	DUF5	Member of the plant-specific DUF724 protein family.
AT2G47620	1	SWI3A	Member of the Arabidopsis SWI3 gene family.
AT2G48110	8	REF4	Encodes a novel protein of unknown function.
AT3G01160	5		FUNCTIONS IN: molecular_function unknown
AT3G01540	9	DRH1	RNA HELICASE DRH1
AT3G03080	3		Zinc-binding dehydrogenase family protein.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT3G03900	1	APK3	Provides activated sulfate for the sulfation of secondary metabolites.
AT3G04560	5		Unknown protein.
AT3G04780	3		Encodes a protein with little sequence identity with any other protein.
AT3G04940	2	CYSD1	Encodes cysteine synthase CysD1.
AT3G05090	7	LRS1	Encodes a DCAF protein. Mutants are defective in lateral root development.
AT3G05940	5		Protein of unknown function (DUF300).
AT3G06530	8, 34		ARM repeat superfamily protein.
AT3G06580	1	GALK	Encodes a protein with galactose kinase activity.
AT3G06630	10		Protein kinase family protein.
AT3G06820	3	BRCC36B	Mov34/MPN/PAD-1 family protein.
AT3G06880	12		Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein.
AT3G07530	6		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Beta-Casp domain (InterPro:IPR022712).
AT3G07700	7		Protein kinase superfamily protein.
AT3G07980	9	MAPKKK6	MAP3K epsilon protein kinase 2 is functionally redundant with MAP3Ke1.
AT3G09010	2		Protein kinase superfamily protein.
AT3G09140	1		Protein of unknown function (DUF674).
AT3G09330	7		Transmembrane amino acid transporter family protein.
AT3G09360	9		Cyclin/Brf1-like TBP-binding protein.
AT3G10160	3	DFC	Encodes a protein with tetrahydrofolylypolyglutamate synthase activity that is located in the mitochondrial matrix.
AT3G10180	1		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT3G10290	3		Nucleotide-sugar transporter family protein.
AT3G10550	8	MTM1	Has 3'-phosphatase activity against both PtdIns3,5P2 and PtdIns3P.
AT3G12070	1	RGTB2	FUNCTIONS IN: catalytic activity.
AT3G12100	7		Cation efflux family protein.
AT3G12110	2	ACT11	Encodes an actin that is expressed predominantly during reproductive development.
AT3G12230	8	scpl14	FUNCTIONS IN: serine-type carboxypeptidase activity.
AT3G12570	2	FYD	LOCATED IN: chloroplast envelope.
AT3G12740	2	ALIS1	Required for the phospholipid translocase activity of ALA3.
AT3G13220	3	ABCG26	Encodes a ATP-binding cassette transporter.
AT3G13225	3		WW domain-containing protein.
AT3G13740	2		Ribonuclease III family protein.
AT3G16060	6		ATP binding microtubule motor family protein.
AT3G16170	9	AAE13	AMP-dependent synthetase and ligase family protein.
AT3G16320	4	CDC27a	Subunit in the anaphase-promoting complex.
AT3G16650	15		Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein.
AT3G17205	4	UPL6	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: HECT, IQ calmodulin-binding region.
AT3G18860	2		Transducin family protein / WD-40 repeat family protein.
AT3G19010	2		2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein.
AT3G19150	1, 2	KRP6	Encodes CDK inhibitor, negative regulator of cell division.
AT3G19184	5		AP2/B3-like transcriptional factor family protein.
AT3G19260	2	LOH2	LAG1 homolog. LOH2 is presumed to function in sphingolipid metabolism.
AT3G19515	5		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Apoptosis inhibitory 5 (InterPro:IPR008383)
AT3G19900	1		Unknown protein.
AT3G21465	6		Unknown protein.
AT3G21620	3		ERD (early-responsive to dehydration stress) family protein.
AT3G21660	7		UBX domain-containing protein.
AT3G22425	4	IGPD	Encodes imidazole glycerolphosphate dehydratase.
AT3G23570	4		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT3G23610	1	DSPTP1	Encodes a dual specificity protein phosphatase.
AT3G24515	3	UBC37	FUNCTIONS IN: ubiquitin-protein ligase activity.
AT3G25230	7	ROF1	Encodes a member of the FK506 binding protein (FKBP) family.
AT3G26440	13		Protein of unknown function (DUF707).
AT3G29080	1		Unknown protein.
AT3G29180	6		Protein of unknown function (DUF1336).
AT3G45040	1		Encodes a putative dolichol kinase.
AT3G45450	4		Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT3G46500	8		2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT3G47340	5	ASN1	Encodes a glutamine-dependent asparagine synthetase.
AT3G47610	3		Transcription regulators; zinc ion binding.
AT3G47750	12	ABCA4	Member of ATH subfamily.
AT3G47760	8	ABCA5	Member of ATH subfamily.
AT3G48540	3		Cytidine/deoxycytidylate deaminase family protein.
AT3G48620	1		Outer membrane OMP85 family protein.
AT3G51010	2		Unknown protein.
AT3G51860	7	CAX3	CONTAINS InterPro DOMAIN: Calcium/proton exchanger superfamily.
AT3G53030	2	SRPK4	Encodes a protein kinase that specifically targets SR splicing factors.
AT3G53080	1		D-galactoside/L-rhamnose binding SUEL lectin protein.
AT3G53270	1, 5		Small nuclear RNA activating complex (SNAPc), subunit SNAP43 protein.
AT3G53930	9		Protein kinase superfamily protein.
AT3G54310	4		Unknown protein.
AT3G54380	2	SAC3C	SAC3/GANP/Nin1/mts3/eIF-3 p25 family.
AT3G54750	7		Unknown protein.
AT3G56320	2		PAP/OAS1 substrate-binding domain superfamily.
AT3G57010	2		Calcium-dependent phosphotriesterase superfamily protein.
AT3G57660	14	NRPA1	Encodes a subunit of RNA polymerase I (aka RNA polymerase A).
AT3G58480	8		Calmodulin-binding family protein.
AT3G58960	1		F-box/RNI-like/FBD-like domains-containing protein.
AT3G59160	2		F-box/RNI-like superfamily protein.
AT3G59270	2		FBD-like domain family protein.
AT3G59310	5		Eukaryotic protein of unknown function (DUF914).
AT3G59350	5		Protein kinase superfamily protein.
AT3G59390	4		Unknown protein.
AT3G59550	9	SYN3	Encodes an alpha-kleisin protein that is localized primarily in the nucleolus.
AT3G59990	4	MAP2B	Encodes a MAP2 like methionine aminopeptidase.
AT3G60860	3		SEC7-like guanine nucleotide exchange family protein.
AT3G60920	10		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Beige/BEACH (InterPro:IPR000409)
AT3G61120	2	AGL13	FUNCTIONS IN: sequence-specific DNA binding transcription factor activity.
AT3G61270	3		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Lipopolysaccharide-modifying protein.
AT3G62080	5		SNF7 family protein.
AT3G62910	7	APG3	Isolated in a screen for chloroplast development mutants.
AT3G63430	1	TRM5	Unknown protein.
AT4G00020	1	BRCA2(IV)	Ortholog of breast cancer susceptibility protein 2. Essential at meiosis.
AT4G00520	11		Acyl-CoA thioesterase family protein;
AT4G00630	7	KEA2	Member of Putative potassium transporter family.
AT4G00700	1		C2 calcium/lipid-binding plant phosphoribosyltransferase family protein.
AT4G01040	2		Glycosyl hydrolase superfamily protein.
AT4G02030	5		Vps51/Vps67 family (components of vesicular transport) protein.
AT4G04080	2	ISU3	Encodes a mitochondrial protein similar to E.coli IscU.
AT4G04540	6	CRK39	Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase.
AT4G04750	2		Major facilitator superfamily protein.
AT4G04760	4		Major facilitator superfamily protein.
AT4G05320	1	UBQ1	One of five polyubiquitin genes in A. thaliana. Induced by salicylic acid.
AT4G06634	5	YY1	Zinc finger (C2H2 type) family protein.
AT4G08350	1	GTA2	FUNCTIONS IN: transcription elongation regulator activity.
AT4G08800	11		Protein kinase superfamily protein.
AT4G10040	1	CYTC-2	Encodes cytochrome c.
AT4G10060	8		Beta-glucosidase, GBA2 type family protein.
AT4G10380	2	NIP5;1	Boric acid channel.
AT4G10955	6		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT4G11230	7		Riboflavin synthase-like superfamily protein.
AT4G11290	3		Peroxidase superfamily protein.
AT4G11420	9	EIF3A	Subunit of a multisubunit complex that is required for binding of mRNA to 40 S ribosomal subunits.
AT4G11440	8		Mitochondrial substrate carrier family protein.
AT4G12400	2	HOP3	Encodes one of the CC-TPR proteins.
AT4G12750	7		Homeodomain-like transcriptional regulator.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT4G12840	7		Protein of unknown function (DUF707).
AT4G14570	5	AARE	Encodes an enzyme catalyzing the N-terminal hydrolysis of N-acylpeptides.
AT4G14965	7	MAPR4	FUNCTIONS IN: heme binding; LOCATED IN: endomembrane system.
AT4G15370	12	BARS1	Encodes an oxidosqualene cyclase.
AT4G15890	6, 7		FUNCTIONS IN: binding.
AT4G16130	13	ARA1	Similar to galactokinase.
AT4G16280	7	FCA	Involved in the promotion of the transition of the vegetative meristem to reproductive development.
AT4G16340	9	SPK1	Encodes the lone DOCK family guanine nucleotide exchange factor.
AT4G16670	5		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF828.
AT4G16800	1		ATP-dependent caseinolytic (Clp) protease/crotonase family protein.
AT4G17240	4		Unknown protein.
AT4G17740	2		Peptidase S41 family protein.
AT4G18780	9	IRX1	Encodes a member of the cellulose synthase family involved in secondary cell wall biosynthesis.
AT4G19520	2		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family.
AT4G20230	2		Terpenoid cyclases/Protein prenyltransferases superfamily protein.
AT4G21000	3	ACA6	FUNCTIONS IN: carbonate dehydratase activity, zinc ion binding.
AT4G21323	2		Subtilase family protein.
AT4G22090	2		Pectin lyase-like superfamily protein.
AT4G22300	10	SOBER1	Encodes a carboxylesterase that inhibits AvrBsT-triggered phenotypes.
AT4G22750	4		DHHC-type zinc finger family protein.
AT4G23140	5	CRK6	<i>A. thaliana</i> receptor-like protein kinase.
AT4G23150	2	CRK7	Encodes a cysteine-rich receptor-like protein kinase.
AT4G23350	4		Protein of Unknown Function (DUF239).
AT4G23650	5	CDPK6	Encodes calcium dependent protein kinase.
AT4G23882	2		Heavy metal transport/detoxification superfamily protein.
AT4G24270	13	EMB14	A locus involved in embryogenesis.
AT4G24290	3		MAC/Perforin domain-containing protein.
AT4G25120	12	(SRS2)	Arabidopsis SRS2 is a functional 3'- to 5'-helicase.
AT4G26300	12	EMB127	NVolved IN: embryo development ending in seed dormancy.
AT4G26620	2		Sucrase/ferredoxin-like family protein.
AT4G26900	17	AT-HF	Encodes a glutamine amidotransferase and cyclase.
AT4G28430	6		Reticulon family protein.
AT4G28470	7	RPN1B	Encoding the RPN subunits of the 26S proteasome.
AT4G29820	3	CFIM-25	Encodes a homolog of the protein CFI-25, a polyadenylation factor subunit.
AT4G29990	11		Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase protein.
AT4G30220	3	RUXF	Small nuclear ribonucleoprotein F (RUXF)
AT4G31480	4		Coatomer, beta subunit.
AT4G31860	2		Protein phosphatase 2C family protein.
AT4G32200	6	ASY2	meiotic asynaptic mutant 2, homologue of ASY1
AT4G32320	8	APX6	Encodes a cytosolic ascorbate peroxidase APX6.
AT4G32714	1	SCRL25	Encodes a member of a family of small, secreted, cysteine rich proteins.
AT4G33410	2	SPPL1	FUNCTIONS IN: aspartic-type endopeptidase activity.
AT4G33800	1		Unknown protein.
AT4G33820	2		Glycosyl hydrolase superfamily protein.
AT4G33920	3		Protein phosphatase 2C family protein.
AT4G34150	3		Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein.
AT4G34310	8		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT4G34320	1		Protein of unknown function (DUF677).
AT4G34390	1, 7	XLG2	Extra-large GTP-binding protein 2.
AT4G34860	3	A/N-InvB	Plant neutral invertase family protein.
AT4G35140	3		Transducin/WD40 repeat-like superfamily protein.
AT4G35740	2	RecQI3	Encodes RECQ3, an ATP-dependent helicase.
AT4G36270	12, 14		ATP binding.
AT4G36280	5		Histidine kinase-, DNA gyrase B-, and HSP90-like ATPase family protein.
AT4G36515	2		Unknown protein.
AT4G36650	2	PBRP	Encodes a protein with similarity to the general transcription factor TFIIB.
AT4G37030	8		Unknown protein.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT4G37990	3	ELI3-2	Encodes an aromatic alcohol:NADP+ oxidoreductase.
AT4G38500	5		Protein of unknown function (DUF616).
AT4G38600	15	KAK	Encodes a member of HECT ubiquitin protein ligase family.
AT4G39230	1		Encodes a protein whose sequence is similar to PCBER.
AT4G39235	1		Unknown protein.
AT5G01400	17	ESP4	Encodes a Symplekin/Pta1 homologue.
AT5G01510	3	RUS5	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF647.
AT5G02610	2		Ribosomal L29 family protein.
AT5G03430	6		Phosphoadenosine phosphosulfate (PAPS) reductase family protein.
AT5G04370	4	NAMT1	A member of the SABATH methyltransferase gene family.
AT5G04480	5		UDP-Glycosyltransferase superfamily protein.
AT5G04920	1		EAP30/Vps36 family protein.
AT5G05080	6	UBC22	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Ubiquitin-conjugating enzyme, E2.
AT5G05930	4	GC1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Guanylyl cyclase (InterPro:IPR018616)
AT5G06150	4	CYC1BAT	Encodes a cyclin whose expression is reduced in response to high salt.
AT5G07760	2		Formin homology 2 domain-containing protein / FH2 domain-containing protein.
AT5G07850	1		HXXXD-type acyl-transferase family protein.
AT5G08170	6	EMB1873	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Agmatine deiminase
AT5G08530	2	CI51	51 kDa subunit of complex I (CI51)
AT5G08580	5		Calcium-binding EF hand family protein.
AT5G08760	1		Unknown protein.
AT5G09730	4	BXL3	This is a member of glycosyl hydrolase family.
AT5G10490	9	MSL2	A member of MscS-like gene family comprising of an N-terminal chloroplast transit peptide.
AT5G10880	2		tRNA synthetase-related / tRNA ligase-related.
AT5G11250	1		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class).
AT5G11650	4		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT5G12380	4	ANNAT8	INVOLVED IN: response to water deprivation, response to salt stress, response to cold, response to heat
AT5G13020	5	EML3	Emsy N Terminus (ENT)/ plant Tudor-like domains-containing protein.
AT5G13980	14		Glycosyl hydrolase family 38 protein.
AT5G14420	3	RGLG2	FUNCTIONS IN: ubiquitin-protein ligase activity.
AT5G14880	2		Potassium transporter family protein.
AT5G15090	2	VDAC3	Encodes a voltage-dependent anion channel.
AT5G16830	2	SYP21	Member of SYP2 Gene Family.
AT5G17000	4		Zinc-binding dehydrogenase family protein; INVOLVED IN: response to oxidative stress
AT5G17020	17	XPO1A	Encodes a member of the exportin protein family which functions as receptors for nuclear export.
AT5G17060	5, 6	ARFB1B	A member of ARF GTPase family.
AT5G17620	5	AUG7	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Plant nuclear matrix 1 (InterPro:IPR010604)
AT5G17770	2	CBR	Encodes NADH:cytochrome (Cyt) b5 reductase.
AT5G17790	2	VAR3	Part of a protein complex required for normal chloroplast and palisade cell development.
AT5G18480	6	PGSIP6	INVOLVED IN: carbohydrate biosynthetic process, biosynthetic process.
AT5G19010	1	MPK16	member of MAP Kinase
AT5G19240	1		Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored.
AT5G19280	2	KAPP	Kinase associated protein phosphatase composed of three domains.
AT5G19440	4		Similar to Eucalyptus gunnii alcohol dehydrogenase of unknown function.
AT5G19930	2		Protein of unknown function DUF92, transmembrane.
AT5G21150	5	AGO9	AGO9-dependent sRNA silencing is crucial to specify cell fate in the Arabidopsis ovule.
AT5G22510	6	INV-E	Encodes a chloroplast-targeted alkaline/neutral invertase that is implicated in the development of the photosynthetic apparatus.
AT5G24280	2, 36	GMI1	Encodes a structural-maintenance-of-chromosomes-hinge domain-containing protein.
AT5G24470	2	PRR5	Encodes a PRR whose mutation affects various circadian-associated biological events. Acts as transcriptional repressor of CCA1 and LHY.
AT5G24540	4	BGLU31	INVOLVED IN: response to other organism.
AT5G24740	35		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Vacuolar protein sorting-associated protein.
AT5G25030	1		FUNCTIONS IN: tRNA binding, aminoacyl-tRNA ligase activity, ATP binding.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT5G25480	2	DNMT2	Encodes a DNA methyltransferase homolog.
AT5G25520	3		SPOC domain / Transcription elongation factor S-II protein
AT5G25860	2		F-box/RNI-like superfamily protein.
AT5G26040	4	HDA2	Encodes a member of the histone deacetylase family proteins.
AT5G26360	8		TCP-1/cpn60 chaperonin family protein.
AT5G27000	16	ATK4	Encodes a kinesin-like protein that binds microtubules.
AT5G27600	12	LACS7	Encode peroxisomal long-chain acyl-CoA synthetase.
AT5G27730	2		Protein of unknown function (DUF1624).
AT5G27970	8		ARM repeat superfamily protein.
AT5G28290	12	NEK3	Encodes a member of the NIMA-related serine/threonine kinases (Neks).
AT5G28350	12		Quinoprotein amine dehydrogenase, beta chain-like; RIC1-like guanyl-nucleotide exchange factor.
AT5G28510	6	BGLU24	FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity.
AT5G36890	1	BGLU42	FUNCTIONS IN: cation binding, hydrolase activity.
AT5G37450	7		Leucine-rich repeat protein kinase family protein.
AT5G38140	5	NF-YC12	FUNCTIONS IN: sequence-specific DNA binding transcription factor activity.
AT5G40480	15	EMB31	INVOLVED IN: embryo development ending in seed dormancy.
AT5G40820	4, 13	ATR	Encodes a Arabidopsis ortholog of the ATR protein kinase that is involved in a wide range of responses to DNA damage.
AT5G41000	5	YSL4	<i>Arabidopsis thaliana</i> metal-nicotianamine transporter YSL4.
AT5G41190	4		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: D-site 20S pre-rRNA nuclease.
AT5G41740	3		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family.
AT5G42970	4	COP8	Encodes subunit 4 of COP9 signalosome complex.
AT5G43630	1	TZP	Encodes a zinc knuckle protein that negatively regulates morning specific growth.
AT5G44510	6	TAO1	Encodes a TIR-NB-LRR protein that contributes to disease resistance.
AT5G45350	1		Proline-rich family protein.
AT5G45560	13		Pleckstrin homology (PH) domain-containing protein / lipid-binding START domain-containing protein.
AT5G45900	4	APG7	Component of autophagy conjugation pathway.
AT5G46020	1		CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Casein kinase substrate, phosphoprotein.
AT5G46140	1		Protein of unknown function (DUF295).
AT5G46190	1		RNA-binding KH domain-containing protein.
AT5G47010	7	LBA1	Required for nonsense-mediated mRNA decay.
AT5G47435	6		Putative formyltetrahydrofolate deformylase. Located in the mitochondrion.
AT5G47940	1		Unknown protein.
AT5G48000	7	CYP78A2	Encodes a member of the CYP708A family of cytochrome P450 enzymes.
AT5G48655	3		RING/U-box superfamily protein.
AT5G49555	13		FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase family protein.
AT5G50330	8		Protein kinase superfamily protein.
AT5G51070	3	ERD1	ATP-dependent Clp protease regulatory subunit
AT5G51090	3		Unknown protein.
AT5G51230	1	EMF2	Polycomb group protein with zinc finger domain.
AT5G51460	2	ATTPPA	Homologous to the C-terminal part of microbial trehalose-6-phosphate phosphatases.
AT5G51840	2		Unknown protein.
AT5G52340	5	EXO7A2	A member of EXO70 gene family, putative exocyst subunits.
AT5G52750	2		Heavy metal transport/detoxification superfamily protein.
AT5G53050	2		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT5G53170	1	FTSH11	Encodes an FtsH protease that is localized to the chloroplast and the mitochondrion.
AT5G53180	6	PTB2	Encodes one of the two PTB protein homologs in the Arabidopsis genome.
AT5G54610	1	ANK	Belongs to the ankyrin repeat protein family.
AT5G55200	5	MGE1	Co-chaperone GrpE family protein.
AT5G55760	9, 10	SRT1	Encodes a member of the SIR2 (sirtuin) family HDAC (histone deacetylase).
AT5G55820	4	WYR	Encodes a plant ortholog of the inner centromere protein (INCENP).
AT5G56160	2		Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein.
AT5G56280	4	CSN6A	One of two genes encoding subunit 6 of COP9 signalosome complex.
AT5G56360	8	PSL4	Encodes PSL4, beta-subunit of endoplasmic reticulum-resident glucosidase II.
AT5G56750	8	NDL1	N-MYC downregulated-like 1.
AT5G57035	4		U-box domain-containing protein kinase family protein.
AT5G57320	3	VLN5	Villin, putative; INVOLVED IN: cytoskeleton organization.

TAIR ID	Intrón	Nombre	Descripción
AT5G57650	1		Eukaryotic translation initiation factor-related.
AT5G58110	4		Chaperone binding;ATPase activators.
AT5G60010	7		Ferric reductase-like transmembrane component family protein.
AT5G60720	9		Protein of unknown function, DUF547.
AT5G60930	1		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT5G61050	2		Histone deacetylase-related / HD-related.
AT5G61170	1		Ribosomal protein S19e family protein.
AT5G61240	10		Leucine-rich repeat (LRR) family protein.
AT5G61250	1	GUS1	Belongs to the plant glycoside hydrolase family 79.
AT5G61530	3		Small G protein family protein / RhoGAP family protein.
AT5G61700	10	ABCA12	Member of ATH subfamily
AT5G61820	1		FUNCTIONS IN: molecular_function unknown.
AT5G61960	5	ML1	Plant-based family of genes encoding RNA binding proteins.
AT5G62310	4	IRE	Encodes a protein with a serine/threonine kinase domain.
AT5G63890	7	HDH	Encodes histidinol dehydrogenase. Up-regulated in response to UV-B.
AT5G64390	4	HEN4	Encodes a KH domain-containing, putative RNA binding protein.
AT5G64813	1	LIP1	Encodes a small GTPase that influences the light input pathway of the plant circadian network.
AT5G65750	3		2-oxoglutarate dehydrogenase, E1 component.
AT5G65900	10		DEA(D/H)-box RNA helicase family protein.
AT5G66020	4	ATSAC1B	Mutants in this gene are unable to express female sterility in response to beta-aminobutyric acid, as wild type plants do.
AT5G66290	4		Unknown protein.
AT5G67100	26	ICU2	Encodes the putative catalytic subunit of the DNA polymerase alpha.

Tabla V. Genes con la expresión más alta o más baja en el mutante *lsm8-1* tras la exposición a 4°C

Genes con mayor o menor señal de hibridación en el mutante *lsm8-1* que en el WT tras la exposición a 4°C durante 24 horas. Los genes regulados por frío están marcados en **negrita**.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
ALTOS			
AT1G05680	3,94	UGT74E2	Encodes a UDP-glucosyltransferase.
AT1G09970	1,38	RLK7	Leucine-rich repeat class of receptor-like kinase (LRR-RLKs). It is involved in the control of germination speed and the tolerance to oxidant stress.
AT1G17300	1,64		Unknown protein.
AT1G21250	1,45	WAK1	Cell wall-associated kinase.
AT1G22720	1,44		Protein kinase superfamily protein.
AT1G22770	1,27	GI	GI promotes flowering under long days in a circadian clock-controlled flowering pathway. Regulates several developmental processes, including cold stress response.
AT1G32870	2,50	NAC13	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: No apical meristem (NAM) protein.
AT1G35710	2,37		Protein kinase family protein with leucine-rich repeat domain.
AT1G36622	1,73		Unknown protein.
AT1G42990	1,43	BZIP60	AtbZIP60 consists of a bZIP DNA binding domain followed by a putative transmembrane domain. Upon ER stress the protein is proteolyzed and the soluble part is translocated into the nucleus.
AT1G55915	1,07		Zinc ion binding.
AT1G59870	1,57	PEN3	ATP binding cassette transporter.
AT1G61110	1,00	NAC025	FUNCTIONS IN: sequence-specific DNA binding transcription factor activity.
AT1G66590	1,21	COX19-1	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: CHCH (InterPro:IPR010625).
AT1G66880	1,08		Protein kinase superfamily protein.
AT1G70810	1,16		Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein.
AT1G71330	1,93	NAP5	Member of NAP subfamily.
AT1G72330	1,47	ALAAT2	Encodes for alanine aminotransferase ALAAT2.
AT1G73805	1,29	SARD1	Encodes a key regulator for ICS1 induction and salicylic acid (SA) synthesis.
AT1G75040	1,31	PR5	Thaumatin-like protein involved in response to pathogens.
AT2G04040	2,71	DTX1	Detoxifying efflux carrier for plant-derived antibiotics and other toxic compounds.
AT2G04050	5,32		MATE efflux family protein.
AT2G04070	3,92		MATE efflux family protein.
AT2G18193	5,15		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT2G18690	1,65		Unknown protein.
AT2G21640	2,91		Encodes a marker for oxidative stress response.
AT2G22807	1,55		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein
AT2G23320	1,09	WRKY15	Encodes WRKY DNA-binding protein.
AT2G25440	1,02	RLP20	FUNCTIONS IN: kinase activity; INVOLVED IN: signal transduction.
AT2G25685	1,60	SCRL17	Encodes a member of a family of small, secreted, cysteine rich proteins.
AT2G29350	1,01	SAG13	Senescence-associated gene.
AT2G29870	1,15		Aquaporin-like superfamily protein.
AT2G29880	1,38		Unknown protein.
AT2G30140	1,26	UGT87A2	UDP-Glycosyltransferase superfamily protein.
AT2G30250	1,48	WRKY25	Member of the plant WRKY transcription factor family. Involved in response to various abiotic stresses, especially salt stress.
AT2G35480	1,62		Unknown protein.
AT2G38470	2,19	WRKY33	Member of the plant WRKY transcription factor family. Involved in response to various abiotic stresses, especially salt stress.
AT2G41100	2,34	TCH3	Encodes a calmodulin-like protein.
AT2G41380	1,09		S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferases superfamily protein.
AT2G42270	1,88		U5 small nuclear ribonucleoprotein helicase.
AT2G47000	3,03	ABCB4	Multidrug resistance P-glycoprotein (MDR/PGP) subfamily of ABC transporters.
AT3G08590	1,41	iPGAM2	Phosphoglycerate mutase, 2,3-bisphosphoglycerate-independent.
AT3G13080	3,83	ABCC3	Encodes an ATP-dependent MRP-like ABC transporter.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
AT3G13950	1,05		Unknown protein.
AT3G17155	1,18		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT3G22360	1,15	AOX1B	Encodes an alternative oxidase whose expression is limited to flowers and floral buds.
AT3G22370	3,26	AOX1A	Plays a role in shoot acclimation to low temperature. Also is capable of ameliorating reactive oxygen species production when the cytochrome pathway is inhibited.
AT3G25250	1,56	AGC2-1	Arabidopsis protein kinase.
AT3G25610	1,39		ATPase E1-E2 type family protein / haloacid dehalogenase-like hydrolase family protein.
AT3G26830	2,20	PAD3	Encodes a cytochrome P450 enzyme that catalyzes the conversion of dihydrocamalexin acid to camalexin.
AT3G30720	1,48	QQS	Involved in: Starch biosynthetic process.
AT3G43180	1,75		RING/U-box superfamily protein.
AT3G49120	1,11	PRXCB	Class III peroxidase. May play a role in generating H ₂ O ₂ during defense response
AT3G50480	1,65	HR4	Homolog of RPW8.
AT3G52400	1,45	SYP122	Syntaxin protein, involved in the negative regulation of defense pathways.
AT3G55980	1,12	SZF1	Salt-inducible zinc finger 1.
AT3G57260	1,63	BGL2	Beta 1,3-glucanase.
AT4G05020	1,17	NDB2	FUNCTIONS IN: disulfide oxidoreductase activity, oxidoreductase activity.
AT4G08850	1,14		Leucine-rich repeat receptor-like protein kinase family protein.
AT4G09647	1,66		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT4G10500	1,03		2-oxoglutarate (2OG) and Fe(II)-dependent oxygenase superfamily protein.
AT4G14225	1,66		A20/AN1-like zinc finger family protein.
AT4G14365	1,76	XBAT34	FUNCTIONS IN: zinc ion binding.
AT4G15760	2,09	MO1	Encodes a protein with similarity to monooxygenases that are known to degrade salicylic acid (SA).
AT4G16680	2,89		P-loop containing nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein.
AT4G17260	1,41		Lactate/malate dehydrogenase family protein.
AT4G18880	1,10	HSF A4A	Member of Heat Stress Transcription Factor (Hsf) family.
AT4G33070	2,02		Thiamine pyrophosphate dependent pyruvate decarboxylase family protein.
AT4G37370	3,31	CYP81D8	Member of CYP81D.
AT4G37910	1,24	mtHsc70-1	INVOLVED IN: protein folding, response to salt stress.
AT5G06040	1,55		Self-incompatibility protein-related.
AT5G10760	1,36		Eukaryotic aspartyl protease family protein.
AT5G15725	1,64		Unknown protein.
AT5G17150	1,07		Cystatin/monellin superfamily protein.
AT5G24530	1,56	DMR6	Encodes a putative 2OG-Fe(II) oxygenase.
AT5G25250	2,04	FLOT1	SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family.
AT5G26920	1,54	CBP60G	Encodes a calmodulin-binding protein.
AT5G41750	1,10		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family.
AT5G42050	1,10		DCD (Development and Cell Death) domain protein.
AT5G42830	2,12		HXXXD-type acyl-transferase family protein.
AT5G43450	3,20		Encodes a protein whose sequence is similar to ACC oxidase.
AT5G46490	1,05		Disease resistance protein (TIR-NBS-LRR class) family.
AT5G52760	1,79		Copper transport protein family.
AT5G54100	2,20		SPFH/Band 7/PHB domain-containing membrane-associated protein family.
AT5G56350	1,09		Pyruvate kinase family protein.
AT5G59616	2,00		Interleukin-1 receptor-associated kinase 4 protein.
AT5G62480	1,86	GSTU9	Encodes glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs.
BAJOS			
AT1G02610	-1,16		RING/FYVE/PHD zinc finger superfamily protein.
AT1G02820	-1,14	LEA3	Late embryogenesis abundant 3 (LEA3) family protein.
AT1G07600	-1,20	MT1A	Metallothionein, binds to and detoxifies excess copper and other metals.
AT1G14150	-1,06	PnsL2	Encodes a subunit of the NAD(P)H dehydrogenase complex located in the chloroplast thylakoid lumen.
AT1G16850	-1,35		Unknown protein.
AT1G17100	-1,20		SOUL heme-binding family protein.
AT1G19350	-1,36	BES1	Encodes brassinosteroid signalling protein.
AT1G19550	-1,51		Glutathione S-transferase family protein.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
AT1G19570	-1,58	DHAR1	Encodes a member of the dehydroascorbate reductase gene family.
AT1G24170	-1,65	LGT9	Encodes a protein with putative galacturonosyltransferase activity.
AT1G29395	-1,09	COR413IM1	Integral membrane protein in the inner envelope of chloroplasts. Provide freezing tolerance.
AT1G35420	-1,22		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT1G48100	-1,29		Pectin lyase-like superfamily protein.
AT1G48350	-1,21	EMB3105	Ribosomal L18p/L5e family protein.
AT1G52550	-1,37		Unknown protein.
AT1G53870	-1,98		Protein of unknown function (DUF567).
AT1G56170	-1,38	NF-YC2	Encodes a protein with similarity to a subunit of the CCAAT promoter motif binding complex of yeast.
AT1G56220	-1,13		Dormancy/auxin associated family protein.
AT1G56280	-1,10	DI19	Encodes a gene whose transcript level in root and leaves increases to progressive drought stress.
AT1G64770	-1,19	PnsB2	Encodes a novel subunit of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex, involved in cyclic electron flow around photosystem I to produce ATP.
AT1G66100	-1,40		Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) protein.
AT1G66410	-1,17	CAM4	Encodes a calmodulin.
AT1G68530	-1,70	KCS6	Encodes a member of the 3-ketoacyl-CoA synthase family.
AT1G70890	-1,14	MLP43	INVOLVED IN: response to biotic stimulus, defense response.
AT1G72230	-1,28		Cupredoxin superfamily protein.
AT1G72630	-1,04	ELF4-L2	CONTAINS InterPro DOMAIN/s: Protein of unknown function DUF1313.
AT1G75900	-1,04		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein.
AT1G76110	-1,26		HMG box protein with ARID/BRIGHT DNA-binding domain.
AT1G78170	-1,05		Unknown protein.
AT1G78370	-1,29	GSTU20	Encodes glutathione transferase belonging to the tau class of GSTs
AT1G79970	-1,45		Unknown protein.
AT2G01850	-1,08	EXGT-A3	EXGT-A3 plays a role in xyloglucan degradation.
AT2G03937	-2,20		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT2G04570	-1,41		GDSL-like Lipase/Acylhydrolase superfamily protein.
AT2G05070	-1,09	LHCb2.2	Encodes a light-harvesting chlorophyll a/b-binding (LHC) protein that constitute the antenna system of the photosynthetic apparatus.
AT2G05540	-2,07		Glycine-rich protein family.
AT2G15050	-1,67	LTP	Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) protein.
AT2G15620	-1,21	NIR1	Involved in the second step of nitrate assimilation.
AT2G20690	-1,32		Molecular function of riboflavin synthase.
AT2G22170	-3,06	PLAT2	Lipase/lipoxygenase, PLAT/LH2 family protein.
AT2G24790	-1,04	COL3	Positive regulator of photomorphogenesis.
AT2G26695	-1,40		Ran BP2/NZF zinc finger-like superfamily protein.
AT2G27385	-1,79		Pollen Ole e 1 allergen and extensin family protein.
AT2G33180	-1,23		Unknown protein.
AT2G33800	-1,04	EMB3113	Ribosomal protein S5 family protein. INVOLVED IN: response to cadmium ion, response to cold, translation.
AT2G35860	-1,18	FLA16	INVOLVED IN: cell adhesion.
AT2G37640	-1,08	EXP3	Member of Alpha-Expansin Gene Family.
AT2G39010	-1,48	PIP2E	INVOLVED IN: transport, response to nematode.
AT2G47180	-1,05	GolS1	Plants over-expressing GolS1 have increased tolerance to salt, chilling, and high-light stress.
AT2G47630	-1,15		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT2G47710	-1,27		Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein.
AT3G02730	-1,18	TRXF1	FUNCTIONS IN: enzyme activator activity.
AT3G06035	-1,29		Glycoprotein membrane precursor GPI-anchored.
AT3G08770	-1,19	LTP6	Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) protein.
AT3G08920	-1,41		Rhodanese/Cell cycle control phosphatase superfamily protein.
AT3G08940	-1,29	LHCb4.2	Lhcb4 2 protein (Lhcb4 2, protein involved in the light harvesting complex of photosystem II.
AT3G09500	-1,20		Ribosomal L29 family protein.
AT3G09540	-1,14		Pectin lyase-like superfamily protein.
AT3G10060	-1,19		FKBP-like peptidyl-prolyl cis-trans isomerase family protein.
AT3G11410	-1,10	PP2CA	Negative regulator of ABA signalling.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
AT3G11930	-1,18		Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein.
AT3G12260	-1,47		LYR family of Fe/S cluster biogenesis protein.
AT3G15450	-1,02		Aluminium induced protein with YGL and LRDR motifs.
AT3G16240	-1,36	DELTA-TIP	Delta tonoplast intrinsic protein, functions as a water channel and ammonium (NH ₃) transporter.
AT3G17020	-1,19		Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein.
AT3G18850	-1,13	LPAT5	FUNCTIONS IN: acyltransferase activity; INVOLVED IN: metabolic process.
AT3G23810	-1,07	SAHH2	FUNCTIONS IN: adenosylhomocysteinase activity
AT3G24420	-1,11		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT3G27690	-1,45	LHC2.3	Belongs to the Lhc super-gene family encodes the light-harvesting chlorophyll a/b-binding (LHC) proteins that constitute the antenna system of the photosynthetic apparatus.
AT3G29030	-1,07	EXPA5	Encodes an expansin.
AT3G43970	-1,04		Unknown protein.
AT3G47710	-1,34	BNQ3	Belongs to a family of atypical non-DNA binding basic helix-loop-helix (bHLH) proteins.
AT3G48360	-1,12	BT2	Encodes an essential component of the TAC1-mediated telomerase activation pathway. BT2 also mediates multiple responses to nutrients, stresses, and hormones.
AT3G48840	-1,42		RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) family protein.
AT3G48990	-1,04	AAE3	AMP-dependent synthetase and ligase family protein.
AT3G49340	-1,24		Cysteine proteinases superfamily protein.
AT3G50440	-1,02	MES10	Encodes a protein shown to have methyl jasmonate esterase activity in vitro.
AT3G51510	-1,17		Unknown protein.
AT3G51600	-1,70	LTP5	Predicted to encode a PR (pathogenesis-related) protein.
AT3G52370	-2,48	FLA15	INVOLVED IN: cell adhesion.
AT3G53420	-1,33	PIP2A	A member of the plasma membrane intrinsic protein subfamily PIP2.
AT3G54210	-1,12		Ribosomal protein L17 family protein.
AT3G54830	-1,21		Transmembrane amino acid transporter family protein.
AT3G56910	-1,12	PSRP5	FUNCTIONS IN: molecular_function unknown.
AT3G58540	-1,10		Unknown protein.
AT3G60530	-1,74	GATA4	Encodes a member of the GATA factor family of transcription factors.
AT3G62550	-1,15		Adenine nucleotide alpha hydrolases-like superfamily protein.
AT3G62980	-1,04	TIR1	Encodes an auxin receptor that mediates auxin-regulated transcription.
AT4G00360	-2,20	CYP86A2	Encodes a member of the CYP86A subfamily of cytochrome p450 genes.
AT4G05150	-1,03		Octicosapeptide/Phox/Bem1p family protein.
AT4G09720	-1,09	RABG3A	FUNCTIONS IN: GTP binding, GTPase activity.
AT4G13500	-1,45		Unknown protein.
AT4G13770	-1,05	CYP83A1	Encodes a cytochrome p450 enzyme.
AT4G14040	-1,11	SBP2	FUNCTIONS IN: selenium binding; INVOLVED IN: polar nucleus fusion.
AT4G14740	-1,61		INVOLVED IN: signal transduction.
AT4G22210	-1,18	LCR85	Encodes a member of a family of small, secreted, cysteine rich protein.
AT4G23600	-1,41	COR13	Encodes cystine lyase.
AT4G23670	-1,38		Polyketide cyclase/dehydrase and lipid transport superfamily protein.
AT4G24972	-1,10	TPD1	Involved in cell specification during anther and pollen development.
AT4G25910	-1,16	NFU3	Encodes a protein containing the NFU domain. Targeted to the chloroplast.
AT4G26530	-1,26	FBA5	Aldolase superfamily protein.
AT4G27360	-1,06		Dynein light chain type 1 family protein.
AT4G27520	-1,22	ENODL2	FUNCTIONS IN: electron carrier activity, copper ion binding.
AT4G28005	-1,05		BEST A. <i>thaliana</i> protein match is: NADH-ubiquinone oxidoreductase-related.
AT4G28030	-1,31		Acyl-CoA N-acyltransferases (NAT) superfamily protein.
AT4G31560	-1,21	HCF153	Encodes a protein involved in the biogenesis of the cytochrome b(6)f complex. Associated with the thylakoid membrane.
AT4G32260	-1,56	PDE334	ATPase, F0 complex, subunit B/B', bacterial/chloroplast.
AT4G38770	-1,26	PRP4	Encodes a proline-rich protein. Predicted to localize to the cell wall.
AT4G39730	-1,01	PLAT1	Lipase/lipoxygenase, PLAT/LH2 family protein.
AT4G39745	-2,04		hydroxyproline-rich glycoprotein family protein.
AT4G39800	-1,09	MIPS1	Myo-inositol-1-phosphate synthase isoform 1.
AT4G39940	-1,05	AKN2	Adenosine-5'-phosphosulfate-kinase.

TAIR ID	FC (log2)	Nombre	Descripción
AT5G02960	-1,07		Ribosomal protein S12/S23 family protein.
AT5G03120	-2,17		Unknown protein.
AT5G03850	-1,06		Nucleic acid-binding, OB-fold-like protein.
AT5G14320	-1,10	EMB3137	Ribosomal protein S13/S18 family.
AT5G15410	-1,02	DND1	Encodes a mutated cyclic nucleotide-gated cation channel.
AT5G17110	-1,64		Cystatin/monellin superfamily protein.
AT5G20700	-1,12		Protein of unknown function (DUF581).
AT5G25610	-1,01	RD22	Responsive to dehydration 22 (RD22) mediated by ABA.
AT5G36920	-1,89		Unknown protein.
AT5G41900	-1,48		alpha/beta-Hydrolases superfamily protein.
AT5G42070	-1,53		Unknown protein.
AT5G42100	-1,14	BG_PPAP	Encodes a plasmodesmal (Pd)-associated membrane protein involved in plasmodesmal callose degradation.
AT5G47560	-1,17	TDT	Encodes a tonoplast malate/fumarate transporter.
AT5G48595	-1,35		Encodes a defensin-like (DEFL) family protein.
AT5G51720	-1,88	NEET	2 iron, 2 sulfur cluster binding.
AT5G52240	-1,06	MSBP1	Encodes a protein with similarity to progesterone-binding proteins in animals.
AT5G53870	-1,03	ENODL1	FUNCTIONS IN: electron carrier activity, copper ion binding.
AT5G65020	-1,09	ANNAT2	Annexins are calcium binding proteins that are localized in the cytoplasm.
AT5G65683	-1,16	WAVH2	Zinc finger (C3HC4-type RING finger) family protein.
AT5G65730	-1,10	XTH6	Hydrolase activity. INVOLVED IN: response to water deprivation.
AT5G66040	-1,07	STR16	Encodes a protein with thiosulfate sulfurtransferase/rhodanese activity.

Tabla VI. Fenotipos de desarrollo descritos en mutantes de componentes del espliceosoma

Fenotipo	Mutantes	Gen/Locus	Función	Referencia
Letal embrionario (Fase globular)				
	<i>emb1644-1</i> <i>emb1644-2</i>	<i>AT5G27720</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM4	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb2816</i>	<i>AT2G03870</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM7	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb140</i>	<i>AT4G24270</i>	U6 snRNP, PRP24	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb1507</i>	<i>AT1G20960</i>	RNA helicasa asociada al espliceosoma, BRR2	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb2733</i>	<i>AT1G32490</i>	RNA helicasa PRP2	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb1220</i>	<i>AT1g60170</i>	Factor de <i>splicing</i> PRP31	(Meinke y col., 2008)
	<i>sus2</i>	<i>AT1G80070</i>	Factor de <i>splicing</i> PRP8	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb2776</i>	<i>AT2G41500</i>	U4/U6 snRNP, PRP4	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb2769</i>	<i>AT3G13200</i>	Proteína asociada a U5	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb2770</i>	<i>AT4G03430</i>	U5 snRNP, PRP6	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb2444</i>	<i>AT2G18510</i>	SAP49	(Meinke y col., 2008)
	<i>emb3011</i>	<i>AT5G13010</i>	RNA helicasa PRP16	(Meinke y col., 2008)
	<i>sgt13018</i>	<i>At1g06220</i>	Snu114/U5-116 kD	(Liu y col., 2009)
Anomalías cotiledones				
3 cotiledones	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>smu1-2</i>	<i>AT1G73720</i>	Factor auxiliar del espliceosoma	(Chung y col., 2009)
	<i>smu2-1</i> <i>smu2-2</i>	<i>AT2G26460</i>	Factor auxiliar del espliceosoma	(Chung y col., 2009)
	<i>dot2</i> <i>mdf-1</i> <i>mdf-2</i>	<i>AT5G16780</i>	U4/U6.U5 tri-snRNP, SART-1	(Petricka y col., 2008; Casson y col., 2009)
Patrón vascular	<i>lsm4-1</i>	<i>AT5G27720</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM4	Sin publicar
	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>lsm4-1</i>	<i>AT5G27720</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM4	Sin publicar
	<i>sad1</i>	<i>AT5G48870</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM5	Sin publicar
	<i>dot2</i>	<i>AT5G16780</i>	U4/U6.U5 tri-snRNP, SART-1	(Petricka y col., 2008)
Letales postembrionarios				
	<i>lsm4-1</i>	<i>AT5G27720</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM4	(Zhang y col., 2011)
	<i>lsm3a/b</i>	<i>AT1G21190</i> <i>AT1G76860</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM3	Sin publicar
	<i>lsm6a/b</i>	<i>AT3G59810</i> <i>AT2G43810</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM6	Sin publicar
	<i>smu1-1</i>	<i>AT1G73720</i>	Factor auxiliar del espliceosoma	(Chung y col., 2009)
	<i>dot2</i> <i>mdf-1</i> <i>mdf-2</i>	<i>AT5G16780</i>	U4/U6.U5 tri-snRNP, SART-1	(Petricka y col., 2008; Casson y col., 2009)

Fenotipo	Mutantes	Gen/Locus	Función	Referencia
Roseta				
Tamaño	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>sad1</i>	<i>AT5G48870</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM5	(Xiong y col., 2001b)
	<i>atsf1-2</i>	<i>AT5G51300</i>	Factor de <i>splicing</i> SF1	(Jang y col., 2014)
	<i>sta1-1</i>	<i>AT4G03430</i>	U5 snRNP, PRP6	(Lee y col., 2006)
	<i>u2af^{35a}</i>	<i>AT1G27650</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
	<i>U2AF^{35B} RNAi</i>	<i>AT5G42820</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
Morfología de las hojas	<i>esp3</i>	<i>AT1G32490</i>	RNA helicasa PRP2	(Herr y col., 2006)
	<i>sad1</i>	<i>AT5G48870</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM5	(Xiong y col., 2001b)
	<i>rid1</i>	<i>AT1G26370</i>	RNA helicasa PRP22	(Ohtani y col., 2013)
	<i>rdm16-1</i>	<i>AT1G28060</i>	U4/U6 snRNP, PRP3	(Huang y col., 2013)
Curvatura abaxial de las hojas	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>u2af^{35a}</i>	<i>AT1G27650</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
Hojas con márgenes serrados	<i>sta1-1</i>	<i>AT4G03430</i>	U5 snRNP, PRP6	(Lee y col., 2006)
	<i>U2AF^{35B} RNAi</i>	<i>AT5G42820</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
Raíces				
Tamaño	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>atsf1-2</i>	<i>AT5G51300</i>	Factor de <i>splicing</i>	(Jang y col., 2014)
	<i>mdf-1</i> <i>mdf-2</i>	<i>AT5G16780</i>	U4/U6.U5 tri-snRNP, SART-1	(Casson y col., 2009)
	<i>smd3-b</i>	<i>At1g20580</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo SM, SMD3	(Swaraz y col., 2011)
	<i>dot2</i>	<i>AT5G16780</i>	U4/U6.U5 tri-snRNP, SART-1	(Petricka y col., 2008)
Raíces secundarias	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>dot2</i>	<i>AT5G16780</i>	U4/U6.U5 tri-snRNP, SART-1	(Petricka y col., 2008)
	<i>AtSAP130 RNAi</i>	<i>AT3G55200</i> <i>AT3G55220</i>	SAP130/SF3b-3	(Aki y col., 2011)
Estatura reducida				
	<i>esp3</i>	<i>AT1G32490</i>	RNA helicasa PRP2	(Herr y col., 2006)
	<i>sta1</i>	<i>AT4G03430</i>	U5 snRNP, PRP6	(Lee y col., 2006)
	<i>sad1</i>	<i>AT5G48870</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM5	(Xiong y col., 2001b)
	<i>atsf1-2</i>	<i>AT5G51300</i>	Factor de <i>splicing</i> SF1	(Jang y col., 2014)
	<i>AtSAP130 RNAi</i>	<i>AT3G55200</i> <i>AT3G55220</i>	SAP130/SF3b-3	(Aki y col., 2011)
	<i>sta1-1</i>	<i>AT4G03430</i>	U5 snRNP, PRP6	(Lee y col., 2006)
	<i>rdm16-1</i>	<i>AT1G28060</i>	U4/U6 snRNP, PRP3	(Huang y col., 2013)

Fenotipo	Mutantes	Gen/Locus	Función	Referencia
Floración				
Flores anómalas	<i>u2af³⁵a</i>	<i>AT1G27650</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
	<i>U2AF^{35B} RNAi</i>	<i>AT5G42820</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
	P _{AP3} :U1-70K antisentido	<i>AT3G50670</i>	U1 snRNP, U1-70K	(Golovkin y Reddy, 2003)
Tiempo de floración				
Temprano	<i>esp3</i>	<i>AT1G32490</i>	RNA helicasa PRP2	(Herr y col., 2006)
	<i>atsf1-2</i>	<i>AT5G51300</i>	Factor de <i>splicing</i> SF1	(Jang y col., 2014)
	<i>sta1-1</i>	<i>AT4G03430</i>	U5 snRNP, PRP6	(Lee y col., 2006)
	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>sad1</i>	<i>AT5G48870</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM5	Sin publicar
Tardío	<i>u2af³⁵a</i>	<i>AT1G27650</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
	<i>U2AF^{35B} RNAi</i>	<i>AT5G42820</i> <i>U2AF^{35B}</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
	<i>smd3-b</i>	<i>At1g20580</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo SM, SMD3	(Swaraz y col., 2011)
	<i>prp39-1-1</i>	<i>At1g04080</i>	U1 snRNP, PRP39	(Wang y col., 2007)
Gametogénesis				
Femenina	<i>gfa1-1</i> <i>gfa1-2</i> <i>clo</i> <i>mee5</i>	<i>AT1G06220</i>	Snu114/U5-116 kD	(Pagnussat y col., 2005; Coury y col., 2007; Moll y col., 2008)
	<i>lis-1</i>	<i>AT2G41500</i>	U4/U6 snRNP, PRP4	(Groß-Hardt y col., 2007)
	<i>ato</i>	<i>AT5G06160</i>	SF3a60/PRP9	(Moll y col., 2008)
	<i>rdm16-3</i>	<i>AT1G28060</i>	U4/U6 snRNP, PRP3	(Huang y col., 2013)
Masculina	<i>AtSAP130</i> <i>RNAi</i>	<i>AT3G55200</i> <i>AT3G55220</i>	SAP130/SF3b-3	(Aki y col., 2011)
	<i>rdm16-3</i>	<i>AT1G28060</i>	U4/U6 snRNP, PRP3	(Huang y col., 2013)
Fertilización				
Morfología de las silicuas	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>AtSAP130</i> <i>RNAi</i>	<i>AT3G55200</i> <i>AT3G55220</i>	SAP130/SF3b-3	(Aki y col., 2011)
	<i>u2af³⁵a</i>	<i>AT1G27650</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
	<i>rdm16-1</i>	<i>AT1G28060</i>	U4/U6 snRNP, PRP3	(Huang y col., 2013)
Número de silicuas	<i>u2af³⁵a</i>	<i>AT1G27650</i>	Subunidad pequeña del factor de <i>splicing</i> U2AF	(Wang y Brendel, 2006)
Alteraciones en las semillas	<i>lsm8-1</i> <i>lsm8-2</i>	<i>AT1G65700</i>	Núcleo del espliceosoma, complejo LSM2-LSM8, LSM8	(Perea-Resa y col., 2012)
	<i>smu1-2</i>	<i>AT1G73720</i>	Factor auxiliar del espliceosoma	(Chung y col., 2009)
	<i>gfa1-1</i> <i>gfa1-2</i>	<i>AT1G06220</i>	Snu114/U5-116 kD	(Coury y col., 2007)
	<i>mdf-1</i> <i>mdf-2</i>	<i>AT5G16780</i>	U4/U6.U5 tri-snRNP, SART-1	(Casson y col., 2009)

8. ANEXO II: PUBLICACIÓN

LSM Proteins Provide Accurate Splicing and Decay of Selected Transcripts to Ensure Normal *Arabidopsis* Development^W

Carlos Perea-Resa,¹ Tamara Hernández-Verdeja,^{1,2} Rosa López-Cobollo,³ María del Mar Castellano,² and Julio Salinas⁴

Departamento de Biología Medioambiental, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, 28040 Madrid, Spain

In yeast and animals, SM-like (LSM) proteins typically exist as heptameric complexes and are involved in different aspects of RNA metabolism. Eight LSM proteins, LSM1 to 8, are highly conserved and form two distinct heteroheptameric complexes, LSM1-7 and LSM2-8, that function in mRNA decay and splicing, respectively. A search of the *Arabidopsis thaliana* genome identifies 11 genes encoding proteins related to the eight conserved LSMs, the genes encoding the putative LSM1, LSM3, and LSM6 proteins being duplicated. Here, we report the molecular and functional characterization of the *Arabidopsis* LSM gene family. Our results show that the 11 LSM genes are active and encode proteins that are also organized in two different heptameric complexes. The LSM1-7 complex is cytoplasmic and is involved in P-body formation and mRNA decay by promoting decapping. The LSM2-8 complex is nuclear and is required for precursor mRNA splicing through U6 small nuclear RNA stabilization. More importantly, our results also reveal that these complexes are essential for the correct turnover and splicing of selected development-related mRNAs and for the normal development of *Arabidopsis*. We propose that LSMs play a critical role in *Arabidopsis* development by ensuring the appropriate development-related gene expression through the regulation of mRNA splicing and decay.

INTRODUCTION

During the last years, an increasing body of evidence indicates that posttranscriptional regulation plays an important role in modulating gene expression during development in eukaryotes (Halbeisen et al., 2008). Most eukaryotic genes are transcribed as precursors (pre-mRNAs) containing intron sequences. In order to yield correct translation products, introns need to be excised to generate mature mRNAs. This process, known as pre-mRNA splicing, is fundamental in both constitutive and regulated gene expression. Pre-mRNA splicing is precisely and efficiently performed by the spliceosome, a large ribonucleoprotein (RNP) complex machinery composed of five small nuclear RNP particles (U1, U2, U4/U6, and U5) and more than 200 polypeptides not tightly associated with snRNPs (Wahl et al., 2009). In many cases, however, the splicing process is flexible enough to allow the generation of alternative transcripts from

a single gene by differential use of splicing sites. Site use may depend on the cell type, developmental stage, or physiological condition, thereby affecting protein diversity and transcript levels (Matlin et al., 2005). The general mechanism of splicing has been well studied in humans and yeast, being largely conserved between these organisms. In plants, the splicing process remains comparatively poorly understood, although the basic mechanisms of spliceosome assembly and intron excision appear to be as in the rest of eukaryotes (Lorković et al., 2000; Reddy, 2001). Consistent with this, the analysis of the *Arabidopsis thaliana* genome for the presence of known spliceosomal proteins indicated that the core of spliceosomal machinery is conserved between plants and animals (Wang and Brendel, 2004). Nonetheless, despite this conservation, incorrect splicing of mammalian pre-mRNAs in plant cells and vice versa denotes the existence of plant-specific splicing regulatory mechanisms requiring plant-specific splicing factors (Lorković et al., 2000; Reddy, 2001; Lorković, 2009). The characterization of different plant splicing proteins, including some Gly-rich RNA binding proteins, SR proteins, RNA helicases, and other RNA binding proteins, have revealed that they are essential for the accurate progress of diverse plant developmental processes (Raab and Hoth, 2007; Barta et al., 2008; Lorković, 2009; Deng et al., 2010; Zhang et al., 2011).

The control of mRNA turnover is another critical aspect in the regulation of eukaryotic gene expression. Two major pathways exist in yeast and mammals for mRNA decay, both of them being initiated by deadenylation through the CARBON CATABOLITE REPRESSION4/PGK PROMOTER DIRECTED OVERPRODUCTION2/NEGATIVE ON TATA-1 complex (Meyer

¹ These authors contributed equally to this work.

² Current address: Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas Universidad Politécnica de Madrid/Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria, Campus de Montegancedo, 28223 Madrid, Spain.

³ Current address: Imperial College London, South Kensington Campus, London SW7 2AZ, United Kingdom.

⁴ Address correspondence to salinas@cib.csic.es.

The author responsible for distribution of materials integral to the findings presented in this article in accordance with the policy described in the Instructions for Authors (www.plantcell.org) is: Julio Salinas (salinas@cib.csic.es).

^W Online version contains Web-only data.

www.plantcell.org/cgi/doi/10.1105/tpc.112.103697

et al., 2004; Parker and Song, 2004). Subsequently, transcripts can be processed by the 3' to 5' or the 5' to 3' decay pathways. In the first pathway, the deadenylated mRNA is degraded by a complex of proteins known as the exosome (Anderson and Parker, 1998). In the second pathway, the mRNA is decapped by the mRNA DECAPPING1 (DCP1)/DCP2 enzyme, making the mRNA susceptible to the EXORIBONUCLEASE1 (XRN1) (Beelman et al., 1996; Dunckley and Parker, 1999). Therefore, decapping is an important node in the regulation of mRNA life-span and is modulated by a set of different proteins (Bonnerot et al., 2000; Coller et al., 2001). The decapping machinery accumulates in discrete cytoplasmic foci named processing bodies (P-bodies), which have been suggested to be functionally involved not only in mRNA decapping (Sheth and Parker, 2003; Cougot et al., 2004) but also in nonsense-mediated mRNA decay (Unterholzner and Izaurralde, 2004; Sheth and Parker, 2006), mRNA storage (Brenques et al., 2005), general translation repression (Coller and Parker, 2005), and microRNA-mediated repression (Bhattacharyya et al., 2006). Although the existence of both the 5' to 3' and the 3' to 5' decay pathways has been documented and their core components identified (Xu et al., 2006; Goeres et al., 2007; Belostotsky and Sieburth, 2009; Lange and Gagliardi, 2010), the governing principles of mRNA decay in plants, as in the case of the splicing process, are still poorly known. Moreover, genetic analyses have also uncovered plant-specific functional features in mRNA degradation pathways that are associated with plant-specific factors (Belostotsky and Sieburth, 2009; Xu and Chua, 2011). In *Arabidopsis*, for instance, no *XRN1*-like gene has been identified. Instead, the cytoplasmic 5' to 3' exoribonuclease activity is performed by *XRN4* (Kastenmayer and Green, 2000; Souret et al., 2004). Plant P-bodies seem to function as yeast and human P-bodies. However, they also contain their own distinct protein components (Xu and Chua, 2011). Plants affected in mRNA turnover display severe developmental perturbations, indicating that proteins related to mRNA decapping and decay play important roles in regulating gene expression during plant development (Xu et al., 2006; Goeres et al., 2007; Belostotsky and Sieburth, 2009; Xu and Chua, 2009, 2011).

The SM-like proteins (LSMs) constitute a large family of proteins that function in multiple aspects of RNA metabolism. In yeast and animals, there are eight highly conserved LSM proteins (LSM1 to LSM8) that form two different heptameric ring complexes, LSM1-7 and LSM2-8, localized in the cytoplasm and nucleus, respectively. LSM1 and LSM8 define and confer the specificity to each complex, while the other proteins (LSM2 to LSM7) participate in both cytoplasmic and nuclear complexes. The LSM1-7 cytoplasmic complex binds to oligoadenylated mRNAs, promoting their decapping and subsequent degradation by the 5' to 3' pathway, and accumulates in P-bodies. The LSM2-8 nuclear complex binds to and stabilizes the U6 small nuclear RNA (snRNA), forms the core of the U6 small nuclear RNP, and functions in pre-mRNA splicing (reviewed in Beggs, 2005; Tharun, 2009). In silico approaches have allowed the identification of potential plant homologs of LSM proteins. *Arabidopsis* has homologs for the eight conserved LSMs, and three of them (LSM1, LSM3, and LSM6) are duplicated (Wang and Brendel, 2004). To date, however, plant LSMs

have not been functionally characterized, and their role in RNA metabolism remains to be determined. Only *Arabidopsis* *LSM5* and *LSM4* genes have been experimentally studied, both of them being related to abscisic acid and osmotic stress signaling (Xiong et al., 2001; Deng et al., 2010; Zhang et al., 2011). Here, we report the molecular and functional characterization of the *Arabidopsis* LSM gene family. Our results indicate that *Arabidopsis* LSM proteins are also organized in two different heptameric complexes localized in the cytoplasm and nucleus. Whereas the cytoplasmic complex (LSM1-7) is involved in P-body formation, mRNA decapping, and, therefore, accurate mRNA decay, the nuclear complex (LSM2-8) is required for U6 snRNA stabilization and, consequently, proper pre-mRNA splicing. Genetic and molecular analyses reveal that LSM1-7 and LSM2-8 complexes are essential for the correct turnover and splicing of selected development-related mRNAs, respectively. Consistent with this, the absence of LSM1 and LSM8 proteins causes severe perturbations in *Arabidopsis* development, which correlates with alterations in developmentally regulated gene expression. We conclude that LSMs play a critical role in *Arabidopsis* development by ensuring the appropriate development-related gene expression through the regulation of mRNA splicing and decay.

RESULTS

The *Arabidopsis* Genome Contains 11 Genes Encoding the Eight Highly Conserved LSM Proteins

Sequence comparisons and motif searches allowed the identification of 11 genes in the *Arabidopsis* genome encoding proteins related to the eight highly conserved proteins that in yeast and animals constitute the heptameric LSM complexes, LSM1-7 and LSM2-8, with three of them, the putative *LSM1*, *LSM3*, and *LSM6*, being duplicated (Wang and Brendel, 2004). The predicted *Arabidopsis* proteins contain the Sm1 and Sm2 motifs that are separated by a nonconserved linker region of variable length and conform the Sm bipartite domain typical of LSM proteins (Tharun, 2009) (see Supplemental Figure 1 online). LSM proteins have also been found in the genomes of different plant species (Proost et al., 2009; Goodstein et al., 2012). A phylogenetic analysis was performed with the LSM proteins from *Arabidopsis* and other representative plant species, including soybean (*Glycine max*), poplar (*Populus trichocarpa*), rice (*Oryza sativa*), and maize (*Zea mays*). Results revealed that all plant genomes analyzed contain genes encoding LSMs related to the eight conserved proteins from yeast and animals and that many of them are present in more than one copy as in the case of *Arabidopsis* *LSM1*, *LSM3*, and *LSM6*. The human LSM proteins were also included in the analysis as an internal control (see Supplemental Figure 2 and Supplemental Data Set 1 online).

RNA gel blot analysis revealed that the 11 *Arabidopsis* LSM genes are expressed in all organs tested, including leaves, roots, flowers, and stems. Each pair of duplicated genes exhibited the same expression pattern (Figure 1A). To determine the expression of LSM genes at the tissue level, transgenic *Arabidopsis* plants containing fusions between all LSM promoters (*LSM_{pro}*)

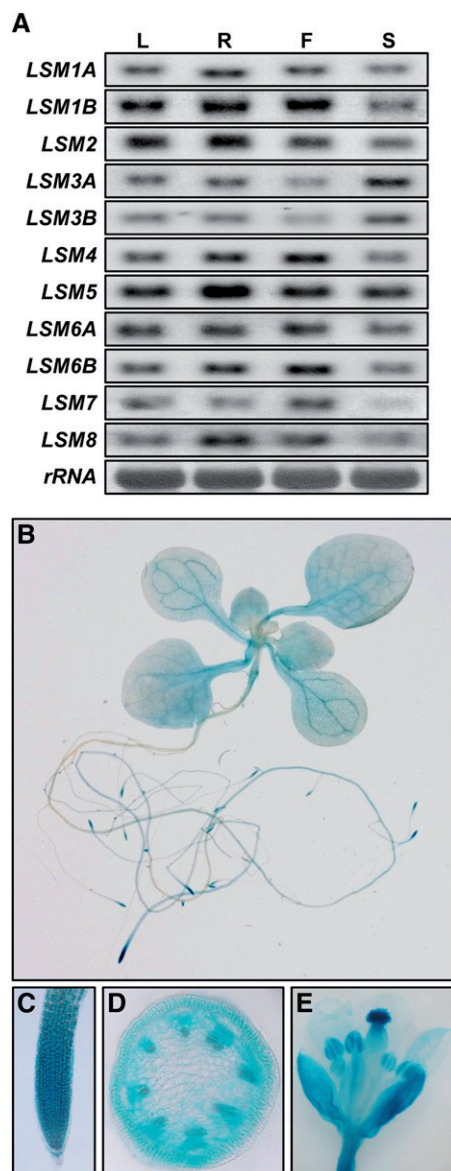


Figure 1. Expression Patterns of *Arabidopsis* LSM Genes.

(A) Expression analysis of LSM genes in different organs of *Arabidopsis* by RNA hybridization using specific probes. Total RNA (20 μ g) from 4-week-old rosette leaves (L), roots (R), flowers (F), and stems (S) was used. *rRNA* levels are shown as a loading control.

(B) to (E) GUS activity in *Arabidopsis* plants containing the fusion *LSM8_{pro}-GUS*. Whole plant (B), root (C), cross section of a stem (D), and flower (E).

and the β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene were generated and assayed for GUS activity. Consistent with the results obtained from the RNA gel blot experiments, nearly constitutive GUS activity was observed in all cases. In leaves and cotyledons, GUS staining was preferentially detected in the vascular tissues. As representative examples, the expression of *LSM8_{pro}-GUS*, *LSM1A_{pro}-GUS*, and *LSM1B_{pro}-GUS* is shown (Figures 1B

to 1E; see Supplemental Figure 3 online). These results demonstrate that the 11 *Arabidopsis* LSM genes are active and ubiquitously expressed.

Subcellular Localization of *Arabidopsis* LSM Proteins

To investigate the subcellular localization of *Arabidopsis* LSM proteins, transgenic *Arabidopsis* expressing genomic LSM-green fluorescent protein (LSM-GFP) fusions driven by the corresponding *LSM_{pro}* were obtained and analyzed. We first examined the subcellular localization of LSM1A, LSM1B, and LSM8, the *Arabidopsis* putative homologs of yeast and animal LSM proteins that differentiate the cytoplasmic and nuclear complexes, respectively. In root cells from seedlings expressing *LSM1A_{pro}-LSM1A-GFP* or *LSM1B_{pro}-LSM1B-GFP*, green fluorescence suggested a cytoplasmic localization of LSM1A and LSM1B (Figure 2A). Conversely, in seedlings expressing the *LSM8_{pro}-LSM8-GFP* fusion, green fluorescence was specifically localized in nuclei (Figure 2A). We also investigated the subcellular localization of *Arabidopsis* LSM3A, LSM3B, and LSM4, whose related yeast and animal proteins participate in both cytoplasmic and nuclear LSM complexes. In root cells from seedlings expressing *LSM3A_{pro}-LSM3A-GFP* or *LSM3B_{pro}-LSM3B-GFP*, green fluorescence was detected in both nuclei and cytoplasm, indicating that LSM3A and LSM3B proteins simultaneously localize to these subcellular compartments (Figure 2A). Similar results were obtained when studying the subcellular localization of the LSM4-GFP fusion protein in seedlings expressing *LSM4_{pro}-LSM4-GFP* (Figure 2A). These data strongly suggest that *Arabidopsis* LSM proteins have subcellular localizations similar to the LSM proteins from other eukaryotes.

Yeast and human LSM1-7 proteins have been described to accumulate in P-bodies (Ingelfinger et al., 2002; Sheth and Parker, 2003). We therefore examined whether *Arabidopsis* LSM proteins belonging to the cytoplasmic complex also localized in these cytoplasmic foci. P-bodies are rarely observed in plants growing under control conditions, whereas their number and size markedly increase under conditions that are associated with high levels of mRNA turnover, such as hypoxic or heat stress (Weber et al., 2008). When seedlings expressing *LSM1A_{pro}-LSM1A-GFP* or *LSM1B_{pro}-LSM1B-GFP* were exposed to heat stress, LSM1A-GFP and LSM1B-GFP were largely localized to discrete cytoplasmic spots (Figure 2B). Under heat stress conditions, LSM3A-GFP, LSM3B-GFP, and LSM4-GFP fusion proteins also localized to cytoplasmic foci in root cells from seedlings expressing *LSM3A_{pro}-LSM3A-GFP*, *LSM3B_{pro}-LSM3B-GFP*, or *LSM4_{pro}-LSM4-GFP*, respectively (Figure 2B). Following cycloheximide treatment, which in yeast and humans results in the loss of P-bodies (Sheth and Parker, 2003), no cytoplasmic foci were observed in any case (Figure 2C), suggesting that the detected cytoplasmic spots of LSM-GFP fusion proteins corresponded to P-bodies. Consistent with its specific nuclear localization, LSM8-GFP did not accumulate in cytoplasmic spots in *LSM8_{pro}-LSM8-GFP* seedlings exposed to heat stress (Figure 2B) or to heat stress plus cycloheximide (Figure 2C). To confirm that the foci defined by *Arabidopsis* cytoplasmic LSM proteins corresponded to P-bodies, we further analyzed their colocalization with DCP1,

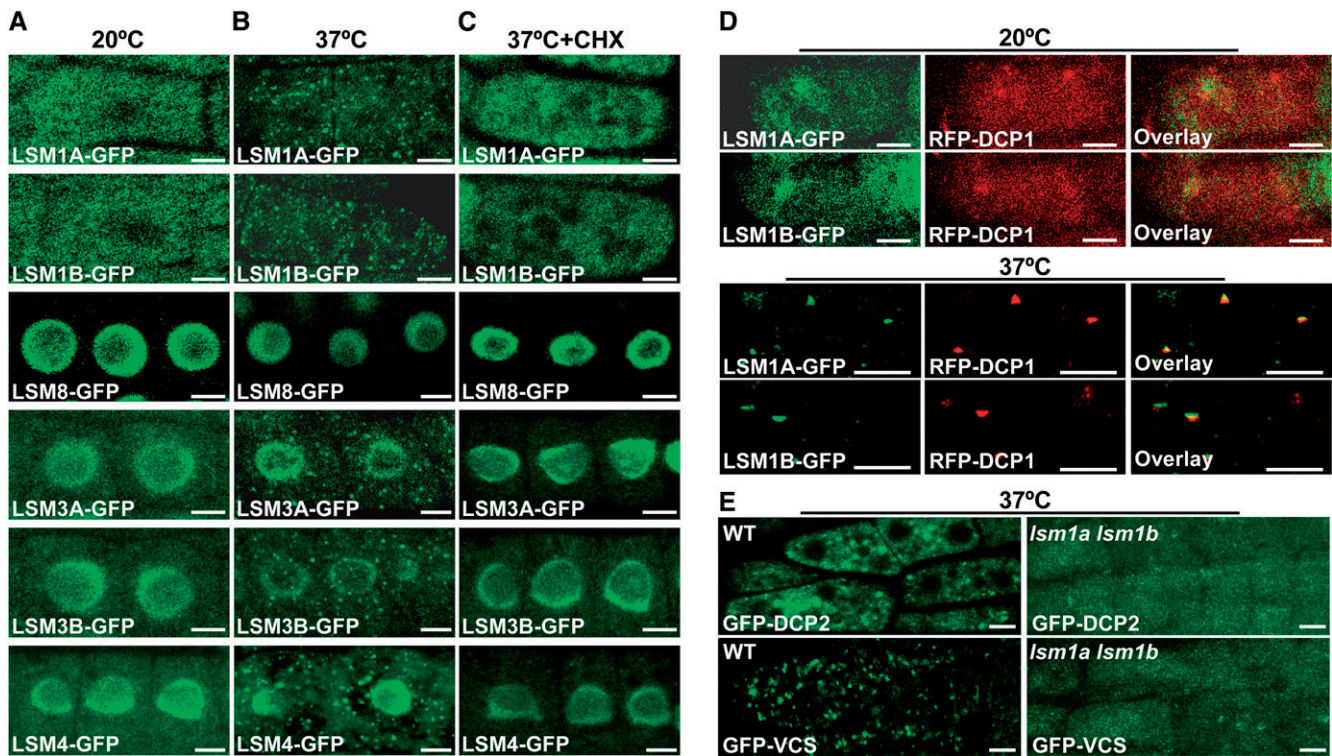


Figure 2. Subcellular Localization of *Arabidopsis* LSM Proteins.

(A) to (C) Subcellular localization of different LSM-GFP proteins in root tip cells from 6-d-old *Arabidopsis* seedlings. Seedlings grown under control conditions (A), seedlings grown under control conditions and subsequently exposed 2 h at 37°C (B), and seedlings grown under control conditions and subsequently exposed 2 h at 37°C with cycloheximide (CHX) (C). Bars = 10 μ m.

(D) Colocalization of LSM1A-GFP and LSM1B-GFP with RFP-DCP1 in root tip cells from 6-d-old *Arabidopsis* seedlings grown under control conditions (top panel) and subsequently exposed 2 h at 37°C (bottom panel). Bars = 10 μ m.

(E) Subcellular localization of GFP-DCP2 and GFP-VCS in root tip cells from 6-d-old wild-type (WT) and *lsm1a lsm1b* *Arabidopsis* seedlings grown under control conditions and subsequently exposed 2 h at 37°C. Bars = 10 μ m.

a protein that belongs to the *Arabidopsis* decapping complex and accumulates in P-bodies (Xu et al., 2006; Goeres et al., 2007). The examination of seedlings expressing *LSM1A_{pro}-LSM1A-GFP* or *LSM1B_{pro}-LSM1B-GFP* cotransformed with a 35S-red fluorescent protein (*RFP*)-*DCP1* fusion revealed that, in fact, LSM1A-GFP and LSM1B-GFP colocalized with RFP-DCP1 in root cells grown at room temperature (20°C) or exposed to 37°C (Figure 2D). Taken together, these observations demonstrate that *Arabidopsis* cytoplasmic LSM proteins accumulate in P-bodies.

DCP2 and VARICOSE (VCS), like DCP1, also belong to the *Arabidopsis* decapping complex and accumulate in P-bodies (Xu et al., 2006; Goeres et al., 2007). Accordingly, GFP-DCP2 and GFP-VCS fusion proteins localized to P-bodies within the cytoplasm of root cells from wild-type seedlings containing 35S-GFP-DCP2 or 35S-GFP-VCS constructs, respectively, exposed to heat stress (Figure 2E). When these constructs were introduced into an *Arabidopsis* mutant defective in LSM1 proteins (*lsm1a lsm1b*; see below) under the same stress conditions, the P-bodies were lost and the GFP-DCP2 and GFP-VCS signals were mostly dispersed in the cytosol (Figure 2E). From these results we conclude that, in addition to accumulating in P-bodies, LSM1 proteins are required for P-body formation in *Arabidopsis*.

Organization of *Arabidopsis* LSM Proteins

As mentioned above, yeast and animal LSM proteins typically exist as highly organized ring-shaped heptameric complexes (Figure 3A) (Tharun, 2009). Having established that *Arabidopsis* LSM proteins subcellularly localize as in other eukaryotes, we decided to study how they are organized. For this, we assayed *in vivo* LSM-LSM interactions by means of bimolecular fluorescence complementation (BiFC) (Hu et al., 2002; Walter et al., 2004) in *Nicotiana benthamiana* leaves. In yeast and animal LSM complexes, LSM1 and LSM8 are flanked by LSM2 and LSM4 (Figure 3A). Our experiments revealed that a significant proportion of cells cotransformed with *LSM1A-nGFP* and *LSM2-cGFP* or *LSM4-cGFP*, and *LSM8-nGFP* and *LSM2-cGFP* or *LSM4-cGFP* displayed green fluorescence (Figure 3B). Identical results were obtained cotransforming *LSM1B-nGFP* with *LSM2-cGFP* or *LSM4-cGFP* (see Supplemental Figure 4 online), indicating that *Arabidopsis* LSM1A, LSM1B, and LSM8 are capable of interacting *in vivo* with LSM2 and LSM4. Consistent with the typical cytoplasmic localization of LSM1 proteins in *Arabidopsis* (Figure 2A), LSM1(A or B)-LSM2 and LSM1(A or B)-LSM4 interactions mainly appeared in the cytoplasm of the *N. benthamiana* cells (Figure 3B; see Supplemental Figure 4 online).

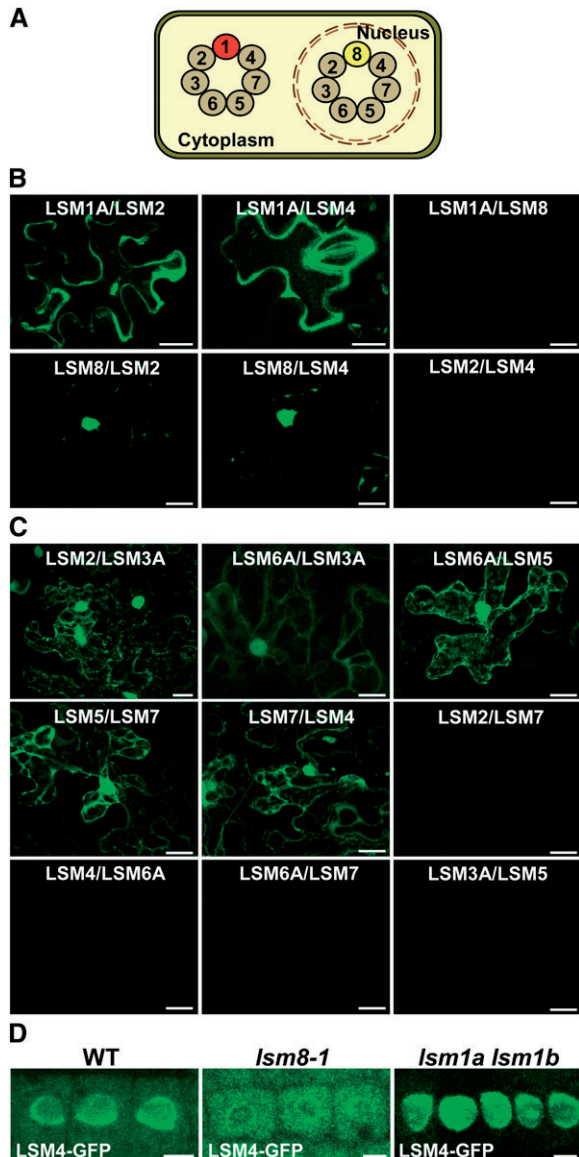


Figure 3. Organization of *Arabidopsis* LSM Proteins.

(A) Cellular model showing cytoplasmic and nuclear heptameric LSM complexes as described in yeast and humans.

(B) and **(C)** Visualization of in vivo interactions between *Arabidopsis* LSM proteins by BiFC assays. The corresponding LSM-nGFP/LSM-cGFP proteins were pairwise tested by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation in *N. benthamiana* leaves. Interactions between LSM1A/LSM2, LSM1A/LSM4, LSM1A/LSM8, LSM8/LSM2, LSM8/LSM4, and LSM2/LSM4 (**B**), and LSM2/LSM3A, LSM6A/LSM3A, LSM6A/LSM5, LSM5/LSM7, LSM7/LSM4, LSM2/LSM7, LSM4/LSM6A, LSM6A/LSM7, and LSM3A/LSM5 (**C**) are presented. Bars = 20 μ m.

(D) Subcellular localization of LSM4-GFP in root tip cells from 6-d-old wild-type (WT), *lsm8-1*, and *lsm1a lsm1b* *Arabidopsis* seedlings grown under control conditions. Bars = 10 μ m.

Conversely, interactions between LSM8 and LSM2 and LSM4 were essentially detected in the nucleus (Figure 3B), which is consistent with the characteristic nuclear localization of *Arabidopsis* LSM8 protein (Figure 2A). The specificity of all these interactions was demonstrated by the fact that, as expected from their different subcellular localization, we did not observe interaction between LSM1 proteins and LSM8 (Figure 3B; see Supplemental Figure 4 online). Interactions between LSM2 and LSM4 proteins were not found either (Figure 3B), in agreement with what has been proposed for yeast and animal LSM complexes (Figure 3A) (Beggs, 2005). However, we detected interactions between LSM2 and LSM3 (A or B), LSM3 (A or B), and LSM6 (A or B); LSM6 (A or B) and LSM5; LSM5 and LSM7; and LSM7 and LSM4 (Figure 3C; see Supplemental Figure 4 online). These interactions parallel those proposed for LSM complexes from other eukaryotes (Beggs, 2005) and were observed simultaneously in both cytoplasm and nucleus (Figure 3C; see Supplemental Figure 4 online), consistent with the subcellular localization of the corresponding LSMs (see above). In addition, also according to the interactions assumed in other LSM complexes (Beggs, 2005), we did not detect interactions between LSM2 and LSM7, LSM4 and LSM6 (A or B), LSM6 (A or B) and LSM7, and LSM5 and LSM3 (A or B) (Figure 3C; see Supplemental Figure 4 online). All of these data indicate that *Arabidopsis* LSMs are organized in two heptameric ring complexes localized in the cytoplasm (LSM1-7) and the nucleus (LSM2-8).

In yeast and animals, cytoplasmic and nuclear LSM complexes are determined by the presence of LSM1 and LSM8 proteins, respectively (Tharun, 2009). The occurrence of a similar structural requirement in *Arabidopsis* complexes was examined by analyzing the subcellular distribution of LSM4, a protein marker of both *Arabidopsis* cytoplasmic and nuclear LSM complexes, in plants deficient in LSM1 and LSM8 proteins. As described above, in root cells from *Arabidopsis* seedlings containing the *LSM4_{pro}-LSM4-GFP* construct, the LSM4-GFP fusion protein was simultaneously detected in both cytoplasm and nucleus (Figure 3D). Interestingly, however, in mutant seedlings for *LSM1* and *LSM8* (*lsm1a lsm1b* and *lsm8*, respectively) bearing the same construct, the fusion protein preferentially localized in nuclei or cytoplasm, respectively (Figure 3D). These observations strongly support the notion that LSM1 and LSM8 proteins are essential for the formation of the cytoplasmic and nuclear LSM complexes, respectively, in *Arabidopsis*.

LSM1- and LSM8-Deficient *Arabidopsis* Mutants Display Severe Developmental Alterations

The results described above indicated that *Arabidopsis* LSMs are also organized in cytoplasmic and nuclear complexes determined by the presence of LSM1 and LSM8 and suggested similar functions as the complexes from yeast and animals. To test this assumption, we first searched for T-DNA insertion mutants in *LSM1* and *LSM8* genes. Plants containing single T-DNA insertions located in the fourth exon of *LSM1A* or in the second intron of *LSM1B* were identified (Figure 4A). *LSM1A* or *LSM1B* mRNAs were undetectable in plants homozygous for the insertions (Figure 4B), revealing that these new *LSM1A* and *LSM1B*

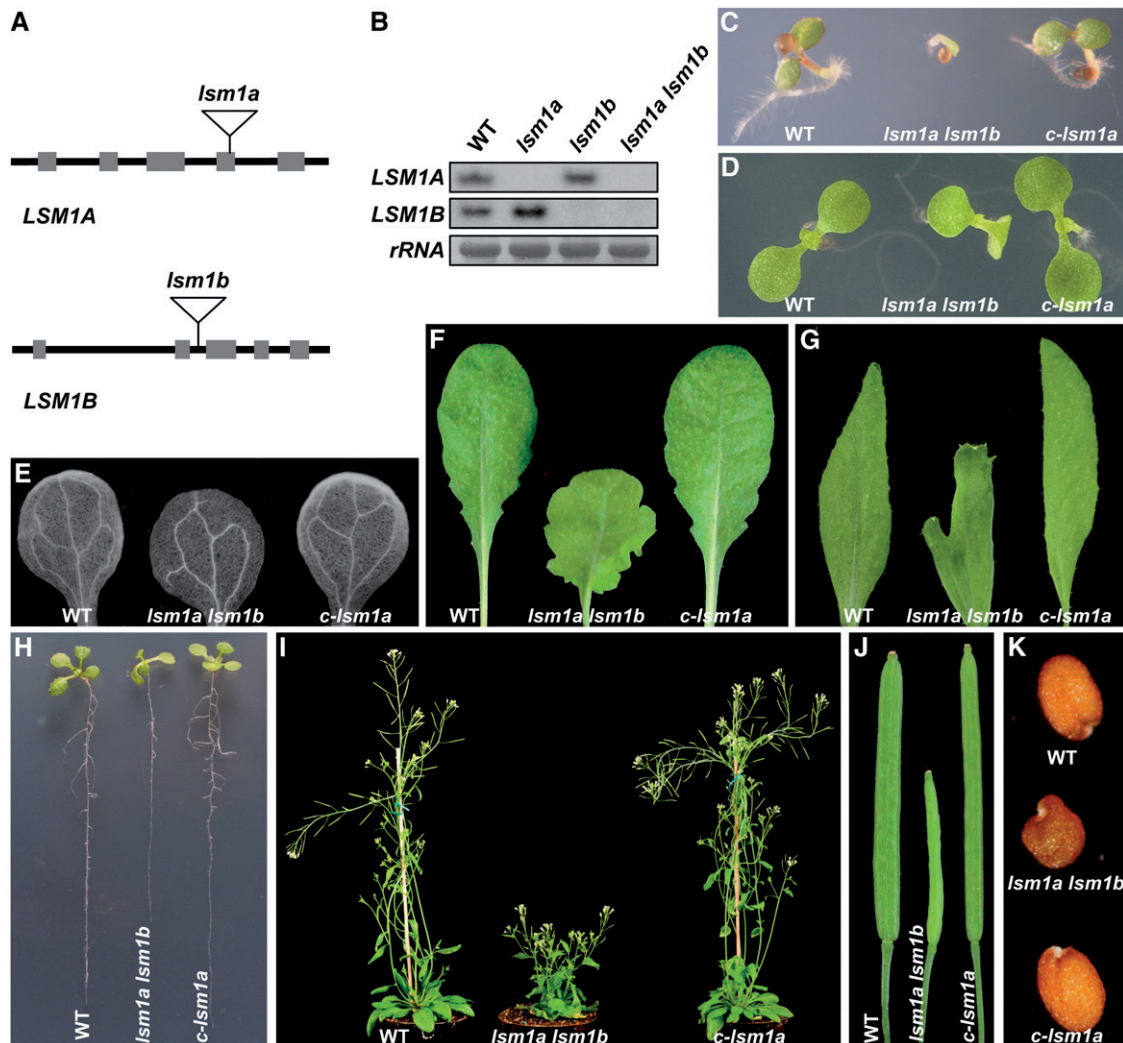


Figure 4. Phenotypic Analysis of *lsm1a lsm1b* Double Mutant.

(A) Schematic representation of *lsm1a* and *lsm1b* T-DNA insertions in *LSM1A* and *LSM1B* genes, respectively. Boxes symbolize exons.

(B) Expression analysis of *LSM1A* and *LSM1B* genes in 2-week-old wild-type (WT), *lsm1a*, *lsm1b*, and *lsm1a lsm1b* *Arabidopsis* plants by RNA hybridization using specific probes. *rRNA* levels are shown as a loading control.

(C) to (K) Morphological phenotypes of wild-type, *lsm1a lsm1b*, and *c-lsm1a* plants. Three-day-old seedlings (C), 5-d-old seedlings (D), cotyledon vein patterns (E), rosette leaves (F), cauline leaves (G), 12-d-old seedlings (H), 6-week-old plants (I), siliques (J), and seeds (K).

alleles (*lsm1a* and *lsm1b*) were null or highly hypomorphic. Intriguingly, *lsm1a* and *lsm1b* plants did not present any obvious morphological or developmental abnormality, being indistinguishable from their corresponding wild-type plants, Nossen-0 (No-0) and Columbia-0 (Col-0) ecotypes, respectively (see Supplemental Figure 5 online).

Since *LSM1A* and *LSM1B* are 80% identical (see Supplemental Figure 1 online), they might be functionally redundant, which would explain the wild-type phenotypes exhibited by *lsm1a* and *lsm1b* single mutant plants. Therefore, we decided to obtain the *lsm1a lsm1b* double mutant that was subsequently backcrossed four times with Col-0 to have both mutations within this genetic background. As expected, *lsm1a lsm1b* plants did not accumulate *LSM1A* and *LSM1B* mRNAs (Figure

4B). Remarkably, in contrast with single mutants, the *lsm1a lsm1b* double mutant showed severe developmental alterations. Seed germination in *lsm1a lsm1b* was delayed compared with the wild type and disturbed, producing epinastic, chlorotic, and small cotyledons (Figures 4C and 4D; see Supplemental Figure 6A online). Cotyledonary veins were disorganized with disruptions, preventing the formation of closed loops as in wild-type veins (Figure 4E; see Supplemental Figure 6C online). *lsm1a lsm1b* rosette and cauline leaves were smaller than wild-type leaves, more serrated, and presented an abnormal venation phenotype and smaller petioles (Figures 4F and 4G; see Supplemental Figures 6D to 6F online). The root system was also altered in *lsm1a lsm1b* plants, with the root length and the number of secondary roots being reduced (Figure 4H; see

Supplemental Figures 6G and 6H online). On the other hand, the elongation of primary and secondary inflorescences ceased prematurely in the double mutant, altering plant architecture and given rise dwarf plants (Figure 4I). *lsm1a lsm1b* plants flowered earlier than wild-type plants under both long- and short-day photoperiods, though this phenotype was much more pronounced under noninductive photoperiodic conditions (see Supplemental Figures 6I and 6J online). Finally, mutant plants produced few siliques that were shorter and contained less seeds than those of wild-type plants (Figure 4J; see Supplemental Figures 6K and 6L online). Moreover, these seeds were small and frequently presented morphological alterations (Figure 4K). *lsm1a lsm1b* plants transformed with either *LSM1A_{pro}-LSM1A-GFP* (*c-lsm1a*) or *LSM1B_{pro}-LSM1B-GFP* (*c-lsm1b*) were rescued for all of the above phenotypes (Figures 4C to 4K; see Supplemental Figures 6 and 7 online), confirming that LSM1A and LSM1B are, in fact, functionally redundant and that the mutant phenotypes displayed by the double mutant were due to the absence of LSM1A and LSM1B expression.

In addition, two transgenic lines were identified that contained single T-DNA insertions located in the fifth exon of *LSM8* (Figure 5A). In homozygous plants for the insertions, *LSM8* mRNA was undetectable, indicating that these new *LSM8* alleles (*lsm8-1* and *lsm8-2*) were null or highly hypomorphic (Figure 5B). *lsm8-1* and *lsm8-2* mutants also exhibited developmental defects (Figure 5; see Supplemental Figure 6 online). Both of them showed the same phenotypes, but they were more pronounced

in *lsm8-1*. Seeds from *lsm8* mutants germinated as wild-type seeds, although a significant percentage of mutant seedlings exhibited alterations in the shape and number of their cotyledons, and veins formed more closed loops in *lsm8* than in wild-type cotyledons (Figures 5C and 5D; see Supplemental Figures 6A to 6C online). *lsm8-1* and *lsm8-2* rosette leaves had short petioles and were smaller and flatter than wild-type leaves, but their vasculature and margins were normal (Figure 5E; see Supplemental Figures 6D to 6F online). Regarding the radicular system, the root length and the number of secondary roots were reduced in *lsm8* mutants compared with the wild type (Figure 5F; see Supplemental Figures 6G and 6H online). The length of primary and secondary inflorescences was not affected in the mutants (Figure 5G). Nonetheless, they flowered significantly earlier than wild-type plants under short-day photoperiods (see Supplemental Figures 6I and 6J online). Although the number of siliques produced in *lsm8* mutants was as in the wild type, they were shorter and contained fewer seeds that frequently aborted (Figures 5H and 5I; see Supplemental Figures 6K and 6L online). *lsm8-1* mutant plants transformed with the construct *LSM8_{pro}-LSM8-GFP* (*c-lsm8*) exhibited wild-type phenotypes (Figures 5C to 5I; see Supplemental Figure 6 online), confirming that their mutant phenotypes were due to the lack of *LSM8* expression. Altogether, these data provide direct evidence that LSM1 and LSM8 proteins are required to ensure correct developmental transitions in *Arabidopsis*, from germination to flowering, and also in seed formation.

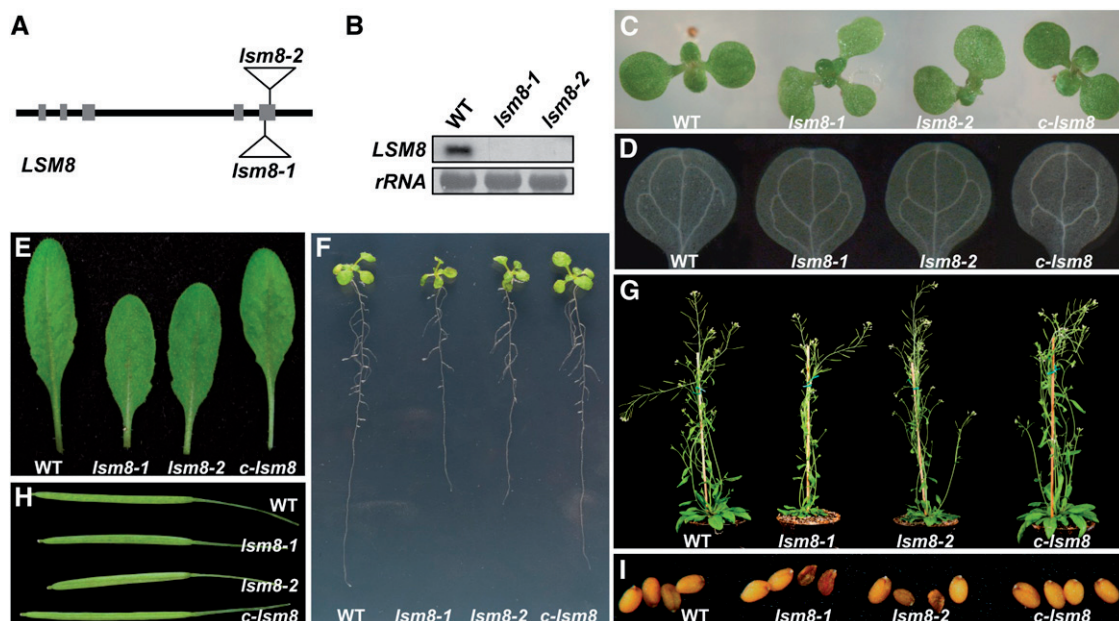


Figure 5. Phenotypic Analysis of *lsm8* Mutants.

(A) Schematic representation of *lsm8-1* and *lsm8-2* T-DNA insertions in the *LSM8* gene. Boxes symbolize exons.

(B) Expression analysis of *LSM8* in 2-week-old wild-type (WT), *lsm8-1*, and *lsm8-2* *Arabidopsis* plants by RNA hybridization using a specific probe. *rRNA* levels are shown as a loading control.

(C) to (I) Morphological phenotypes of wild-type, *lsm8-1*, *lsm8-2*, and *c-lsm8* plants. Five-day-old seedlings (C), cotyledon vein patterns (D), rosette leaves (E), 12-d-old seedlings (F), 6-week-old plants (G), siliques (H), and seeds (I).

Accumulation of Capped Transcripts and mRNA Stability Are Affected in *lsm1a lsm1b* Mutants

The possibility that the *Arabidopsis* LSM1-7 cytoplasmic complex functions in mRNA degradation, as described in yeast and animals (Bouveret et al., 2000; Tharun et al., 2000), was tested by analyzing the decay rates of several mRNAs that have been reported to be unstable transcripts, such as *EXPANSIN-LIKE1* (*EXPL1*), *ARABIDOPSIS ORTHOLOG OF HS1 PRO1-2* (*ATHSPRO2*), *JASMONATE-ZIM-DOMAIN PROTEIN6* (*JAZ6*), *ARABIDOPSIS NITRATE REDUCTASE2* (*NIA2*), *JAZ1*, and *RELATED TO ABI3/VP1 1* (*RAV1*) (Gutiérrez et al., 2002), in *lsm1a lsm1b* and wild-type plants. As a control, we also analyzed the turnover of *EUKARYOTIC TRANSLATION INITIATION FACTOR 4A1* (*EIF4A1*) mRNA, which is considered a stable transcript (Gutiérrez et al., 2002). Decay rates were assayed by comparing relative levels of mRNAs following cordycepin-induced transcriptional arrest (Gutiérrez et al., 2002). Our results confirmed the instability of the former mRNAs and the stability of the latter in the wild type (Figure 6A). In *lsm1a lsm1b*, however, the steady state levels of all unstable transcripts analyzed were higher than in wild-type plants and their rates of decay clearly reduced, their estimated half-lives (the time required for an mRNA to be reduced to half its initial value) being at least two times longer (Figures 6A and 6B). As expected, the steady state levels and the decay rate of *EIF4A1* RNA were similar in mutant and wild-type plants (Figures 6A and 6B). The analysis of the stability of *EXPL1*, *ATHSPRO2*, *JAZ6*, and *EIF4A1* transcripts in *c-lsm1a* and *c-lsm1b* plants confirmed that LSM1A and LSM1B are functionally redundant and demonstrated that the increased mRNA stability noticed in *lsm1a lsm1b* was caused by the simultaneous absence of LSM1A and LSM1B expression (Figures 6C and 6D; see Supplemental Figures 8A and 8B online). We also examined the stability of *EXPL1*, *JAZ6*, and *EIF4A1* mRNAs in *lsm1a*, *lsm1b*, and *lsm8-1* single mutants. As presumed, all mRNAs showed similar turnover in cordycepin-treated wild-type and mutant plants (see Supplemental Figures 8C to 8H online), confirming again the functional redundancy of LSM1A and LSM1B and establishing that the *Arabidopsis* LSM2-8 nuclear complex does not play a role in cytoplasmic mRNA degradation.

We next assessed whether the reduction of mRNA decay observed in *lsm1a lsm1b* could be due to a deficiency in its mRNA decapping capacity. For this, rapid amplification of cDNA ends (RACE)-PCR that allows detection of capped forms of specific mRNAs was used. PCR experiments with low and high number of cycles were performed. In both cases, we found that *EXPL1*, *ATHSPRO2*, and *JAZ6* mRNAs accumulated in their capped form in the *lsm1a lsm1b* mutant compared with the wild type (Figure 6E). These effects were corrected by expression of LSM1A and LSM1B transgenes in *c-lsm1a* and *c-lsm1b* plants, respectively (Figure 6E). The capped forms of mRNAs corresponding to the above genes were found not to be changed in *lsm1a*, *lsm1b*, and *lsm8-1* mutants (see Supplemental Figure 8I online). These results indicated that the *Arabidopsis* LSM1-7 complex operates in cytoplasmic mRNA degradation by promoting decapping.

Loss of LSM8 Influences U6 snRNA Stability and Results in pre-mRNA Splicing Defects

In yeast and animals, the LSM2-8 nuclear complex acts in pre-mRNA splicing by stabilizing the spliceosomal U6 snRNA (Beggs, 2005). To determine whether the *Arabidopsis* LSM nuclear complex has a similar function, we first analyzed the effects of LSM8 on pre-mRNA splicing at the genome-wide level using tiling arrays (Affymetrix *Arabidopsis* Tiling 1.0R) and total RNAs from wild-type and *lsm8-1* mutant plants. Two-week-old plants were selected for these experiments as they represent an intermediate stage of development. We searched for introns with significantly higher hybridization signals in mutant than in wild-type plants. Thus, we identified 469 introns, belonging to 453 genes, with increased hybridization signals in *lsm8-1* (see Supplemental Data Set 2A online). The increased hybridization signals detected in *lsm8-1* should reflect intron retention since hybridization signals in other introns and exons of the genes did not differ between wild-type and *lsm8-1* plants. These results were validated by RT-PCR for a subset of genes pertaining to different ontology categories, including protein metabolism (*AT1G17960*), intracellular transport (*AT3G59390*), developmental processes [*ARABIDOPSIS THALIANA PROTEIN ARGININE METHYLTRANSFERASE 4A* (*PRMT4A*)] or signal transduction [*CASEIN KINASE-LIKE5* (*CKL5*) and *PROTEIN KINASE AME3* (*AME3*)], in both *lsm8-1* and *lsm8-2* mutants (Figure 7A; see Supplemental Figure 9 online). However, the intron retention events in these genes were not detected in *c-lsm8* and *lsm1a lsm1b* plants (Figure 7A), confirming that the splicing defects unveiled in *lsm8* mutants were specifically due to the loss of LSM8 function and that the *Arabidopsis* LSM1-7 cytoplasmic complex is not involved in pre-mRNA splicing. As a control, tiling array data were also validated by analyzing the retention of an intron of *ACTIN-RELATED PROTEIN4* (*ARP4*), a gene that did not display any intron retention event in the array, in *lsm8-1* and *lsm8-2* mutants. As expected, the intron was not retained in these plants (Figure 7A).

Next, we investigated the possible role of the *Arabidopsis* LSM nuclear complex in U6 snRNA stability by assessing the levels of this snRNA in cordycepin-treated *lsm8* mutant and wild-type plants. Results revealed that the steady state levels of U6 snRNA were lower in mutants than in wild-type plants and that after cordycepin treatment these levels were maintained in wild-type plants but decreased rapidly in *lsm8-1* and *lsm8-2* mutants (Figure 7B). Therefore, the stability of U6 snRNA is dependent on the presence of LSM8 and, consequently, on the LSM2-8 nuclear complex. The effect of LSM8 on U6 snRNA stability seems to be highly specific since the levels of U3 small nucleolar RNA (snoRNA), which is transcribed by RNA polymerase III like the U6 snRNA, and U4 snRNA, which is synthesized by RNA polymerase II, did not decrease in cordycepin-treated *lsm8* mutants (Figure 7B). As expected, *c-lsm8* and *lsm1a lsm1b* plants showed similar levels of U6 snRNA, U3 snoRNA, and U4 snRNA as the wild type before and after cordycepin treatment (Figure 7C; see Supplemental Figure 10 online). Therefore, it was concluded that the *Arabidopsis* LSM2-8 nuclear complex is essential for accurate splicing of selected mRNAs through the stabilization of the spliceosomal U6 snRNA.

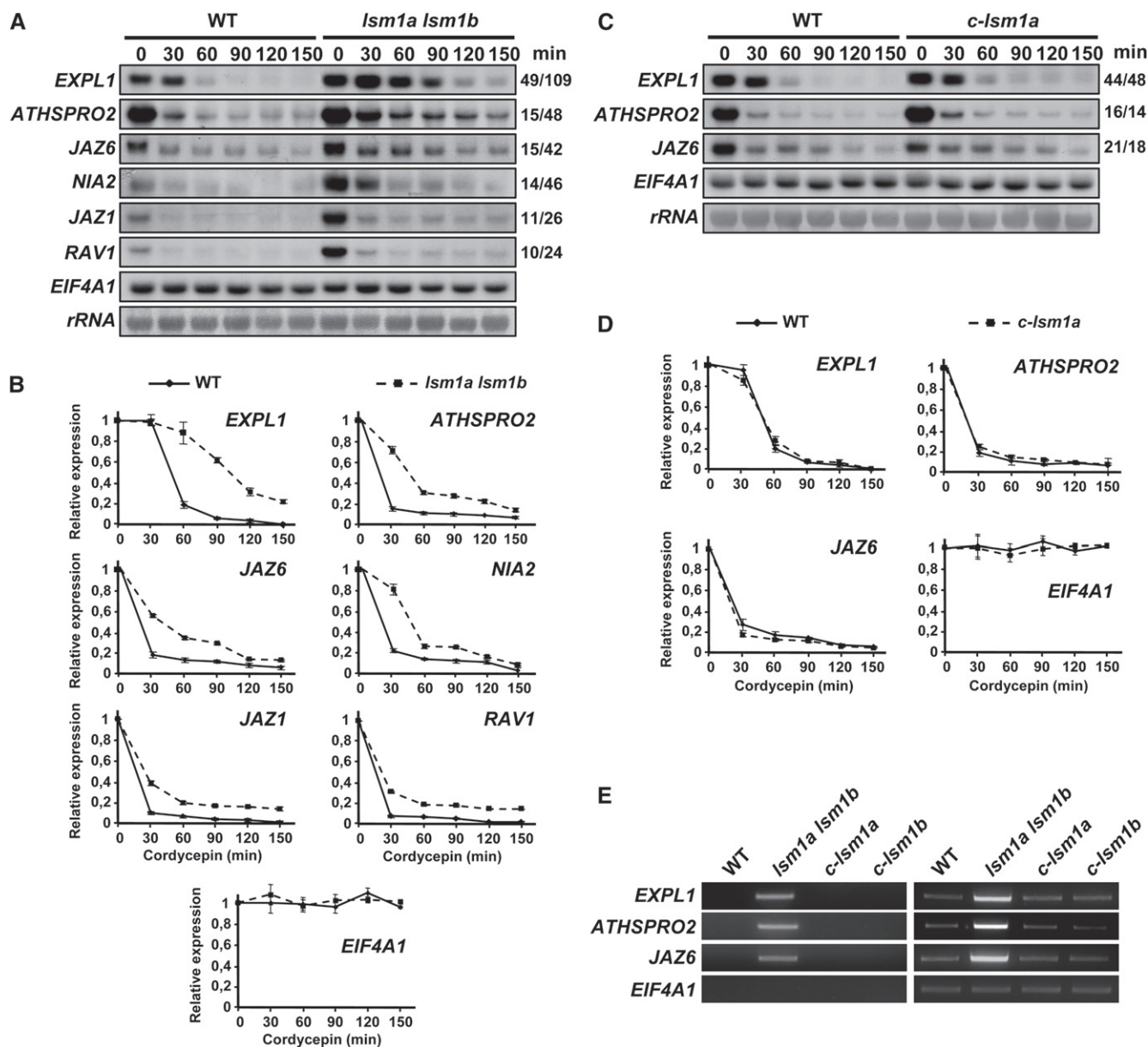


Figure 6. mRNA Stability and Accumulation of Capped Transcripts in the *lsm1a lsm1b* Double Mutant.

(A) to (D) Transcript accumulation in *lsm1a lsm1b* and *c-lsm1a* plants. Levels of several transcripts in 6-d-old *Arabidopsis* seedlings of the wild type (WT) and *lsm1a lsm1b* (A) and (B) and of the wild type and *c-lsm1a* (C) and (D) at different minutes after cordycepin treatment.

(A) and (C) RNA hybridizations using specific probes. *rRNA* levels were used as a loading control. The estimated half-life (min) of mRNAs is shown to the right of each panel (wild type/analyzed genotype).

(B) and (D) Normalized quantification of the hybridization bands corresponding to genes of (A) (shown in [B]) and (C) (shown in [D]).

(E) Accumulation of capped transcripts corresponding to different genes in 6-d-old wild-type, *lsm1a lsm1b*, *c-lsm1a*, and *c-lsm1b* *Arabidopsis* seedlings by RACE-PCR. RACE-PCR products obtained using a low (left panel) and high (right panel) number of cycles are shown. The products of *EIF4A1*, also derived from RACE-PCR, were used as a loading control.

***Arabidopsis* Mutants Deficient in LSM1 or LSM8 Proteins Exhibit Altered Development-Related Gene Expression**

In an attempt to understand the function of LSM complexes in *Arabidopsis* development, we studied the global impact of *lsm1*

and *lsm8* mutations on gene expression. The comparison of mRNA profiles from *lsm1a lsm1b* and the wild type was performed using Agilent *Arabidopsis* Oligo Microarrays v4 and total RNAs extracted from 2-week-old plants. Transcript levels of 358 genes were found to be higher, by at least twofold, in *lsm1a*

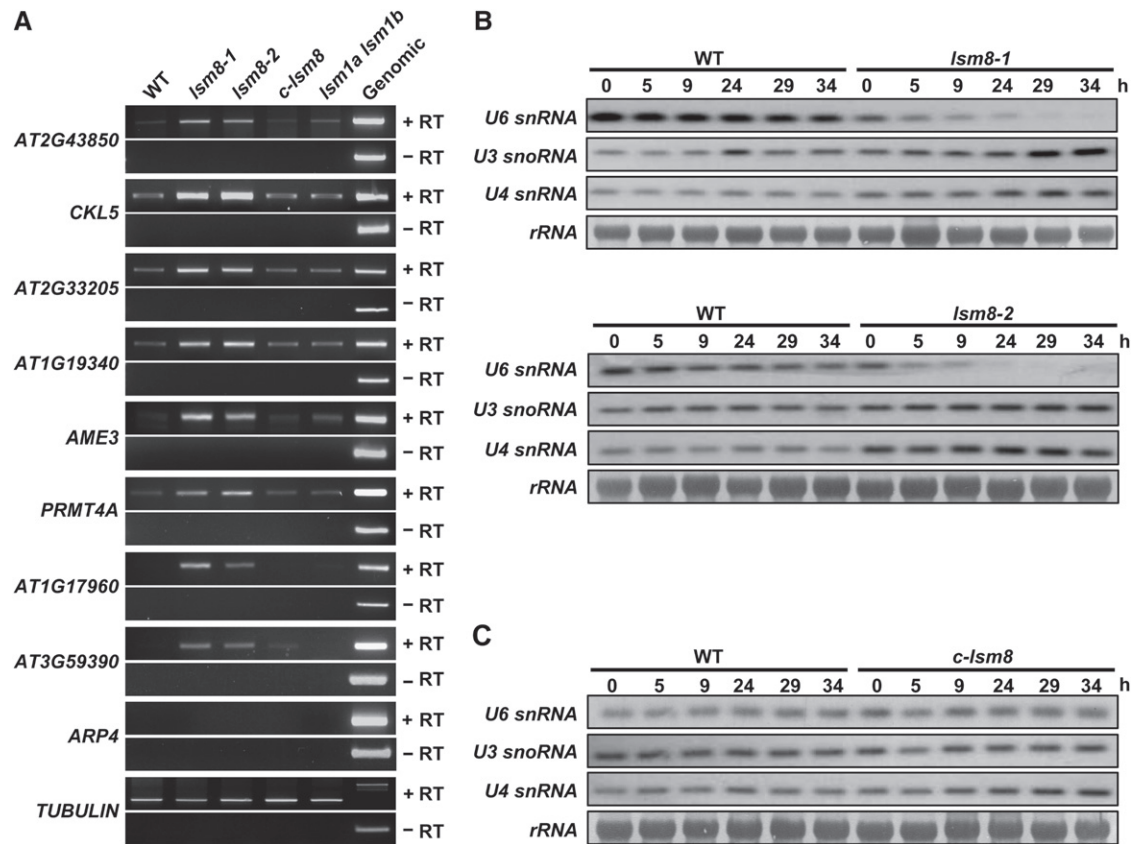


Figure 7. Intron Retention and U6 snRNA Stability in *lsm8* Mutants.

(A) Validation of intron retention events in different genes identified by tiling arrays in the *lsm8-1* mutant. RT-PCR was performed with total RNA from 2-week-old wild-type (WT), *lsm8-1*, *lsm8-2*, *c-lsm8*, and *lsm1a lsm1b* *Arabidopsis* plants and specific pairs of primers for each gene. In all cases, one primer was situated inside the retained intron and the other in an adjacent exon. Genomic DNA (Genomic) was used as a control. +RT indicates reactions with reverse transcriptase (RT). Control reactions without RT (–RT) were also performed. *TUBULIN* expression is shown as a loading control. **(B)** and **(C)** Stability of U6 snRNA in *lsm8-1*, *lsm8-2*, and *c-lsm8* plants. Levels of U6 snRNA, U3 snoRNA, and U4 snRNA in 6-d-old *Arabidopsis* seedlings of the wild type, *lsm8-1*, and *lsm8-2* **(B)** and of the wild type and *c-lsm8* **(C)** at different hours after cordycepin treatment, as shown by RNA hybridization using specific probes. *rRNA* levels were used as a loading control.

lsm1b than in the wild type (see Supplemental Data Set 2B online). On the other hand, transcripts corresponding to 316 genes were reduced by more than twofold in *lsm1a lsm1b* compared with the wild type (see Supplemental Data Set 2B online). Gene ontology analysis of deregulated genes in the double mutant unveiled that 72 of them were implicated in developmental processes, including seed germination, root and leaf development, inflorescence development, flowering, and embryogenesis (see Supplemental Data Set 2B online), which is consistent with its severe mutant phenotype (Figures 4C to 4K). The microarray data were validated, confirming the altered expression of several overexpressed and underexpressed genes related to different developmental processes in *lsm1a lsm1b* plants by quantitative RT-PCR (Figures 8A and 8B). On the other hand, *c-lsm1a* and *c-lsm1b* plants exhibited wild-type expression patterns for all validated genes (Figures 8A and 8B), demonstrating that the LSM1-7 cytoplasmic complex is required for the accurate expression of development-related genes in *Arabidopsis*.

Since the *Arabidopsis* LSM cytoplasmic complex functions in mRNA degradation by promoting decapping (see above), the high levels of some development-related mRNAs detected in the absence of LSM1 proteins might be due to a selective stabilization of the corresponding transcripts as a result of the retention of their 5' cap. This possibility was first examined by measuring the degradation rates of five development-related mRNAs (*YELLOW-LEAF-SPECIFIC GENE9* [YLS9], *UDP-GLUCOSYL TRANSFERASE 87A2* [UGT87A2], *ARABIDOPSIS THALIANA EXPANSIN-LIKE14* [ATEXP14], *MATERNAL EFFECT EMBRYO ARREST14* [MEE14], and *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX12* [ATHB12]), whose levels were elevated in the *lsm1a lsm1b* double mutant, in cordycepin-treated wild-type and *lsm1a lsm1b* plants. Interestingly, the decay of all transcripts, except *ATHB12*, was significantly slower in the mutant than in wild-type plants (Figure 8C). In addition, all transcripts, but not *ATHB12*, retained their 5' cap in *lsm1a lsm1b* (Figure 8D), providing evidence that, in fact, the *Arabidopsis* LSM1-7 cytoplasmic complex is essential for correct developmental gene expression by regulating the decapping and,

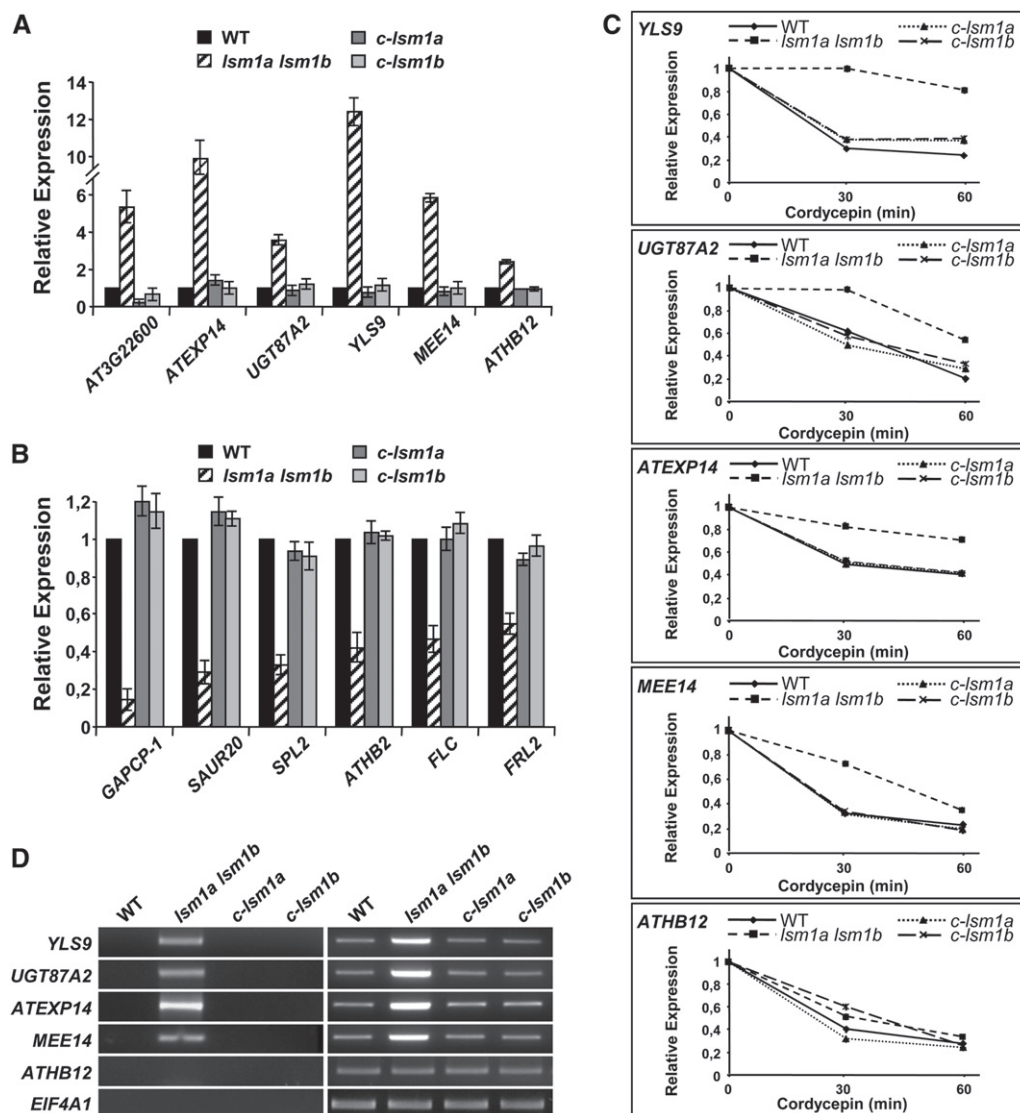


Figure 8. Accumulation of Development-Related Transcripts in the *lsm1a lsm1b* Double Mutant.

(A) and **(B)** Expression levels of different developmental genes detected in the microarray with altered expression in *lsm1a lsm1b*. The relative levels of 12 RNAs that in the microarray were increased **(A)** or decreased **(B)** are shown. Real-time RT-PCR analyses were performed with total RNA from 2-week-old wild-type (WT), *lsm1a lsm1b*, *c-lsm1a*, and *c-lsm1b* *Arabidopsis* plants and specific pairs of primers for each gene.

(C) Accumulation of transcripts corresponding to several developmental genes detected in the microarray with increased expression in *lsm1a lsm1b*. In all cases, the relative transcript levels were determined by real-time RT-PCR analysis, as described above, in wild-type, *lsm1a lsm1b*, *c-lsm1a*, and *c-lsm1b* *Arabidopsis* plants at different minutes after cordycepin treatment. Values are relative to the control values obtained for each genotype.

(D) Accumulation of capped transcripts corresponding to genes analyzed in **(C)** in 2-week-old wild-type, *lsm1a lsm1b*, *c-lsm1a*, and *c-lsm1b* *Arabidopsis* plants by RACE-PCR. RACE-PCR products obtained using a low (left panel) and high (right panel) number of cycles are shown. The products of *EIF4A1*, also derived from RACE-PCR, were used as a loading control.

therefore, the stabilization of specific development-related transcripts. Accordingly, the degradation rates and cap levels of YLS9, UGT87A2, ATEXP14, MEE14, and ATHB12 transcripts in *c-lsm1a* and *c-lsm1b* plants were as in the wild type (Figures 8C and 8D).

The effect of *lsm8* mutations on gene expression at a genome-wide level was determined analyzing the above-mentioned tiling arrays, which, in addition to allowing splicing analysis, constitute a robust platform for detection of transcriptional activity (Laubinger

et al., 2008). Compared with the wild type, 65 and 193 annotated genes were found to be at least twofold up- and downregulated, respectively, in the *lsm8-1* mutant (see Supplemental Data Set 2C online). Gene ontology categorization of these deregulated genes revealed that a considerable number (17 upregulated and 50 downregulated) were related to developmental processes throughout the *Arabidopsis* life cycle (see Supplemental Data Set 2C online), which could explain the mutant phenotypes

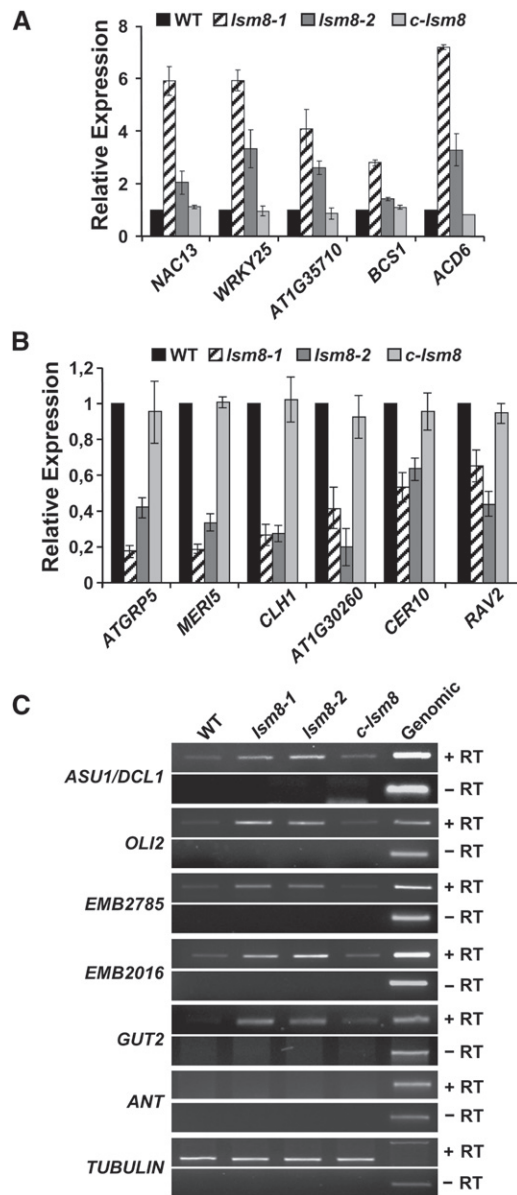


Figure 9. Intron Retention in Developmental Genes in *lsm8* Mutants.

(A) and **(B)** Expression levels of different development-related genes detected in the tiling array with altered expression in *lsm8* mutants. The relative levels of 11 RNAs that were increased **(A)** or decreased **(B)** in the array are shown. Real-time RT-PCR analyses were performed with total RNA from 2-week-old wild-type (WT), *lsm8-1*, *lsm8-2*, and *c-lsm8* *Arabidopsis* plants and specific pairs of primers for each gene.

(C) Validation of intron retention events in some developmental genes identified by tiling arrays in *lsm8-1*. RT-PCR was performed with total RNA from 2-week-old wild-type, *lsm8-1*, *lsm8-2*, and *c-lsm8* *Arabidopsis* plants and specific pairs of primers for each gene. In all cases, one primer was situated inside the retained intron and the other in an adjacent exon. Genomic DNA (Genomic) was used as a control. +RT indicates reactions with reverse transcriptase (RT). Control reactions without RT (–RT) were also performed. *TUBULIN* expression is shown as a loading control.

exhibited by *lsm8* mutants (Figures 5C to 5I). Microarray results were validated by assaying the expression of a group of deregulated genes implicated in different developmental processes in wild-type, *lsm8-1*, *lsm8-2*, and *c-lsm8* plants by quantitative RT-PCR (Figures 9A and 9B). These data demonstrated that the *Arabidopsis* LSM2-8 nuclear complex is also crucial for appropriate development-related gene expression.

Considering that the LSM2-8 nuclear complex regulates development-related gene expression and functions in pre-mRNA splicing (see above), it was presumed that a number of genes involved in development might display splicing defects. Remarkably, 65 out of the 453 genes that showed intron retention events were found to be related to different developmental processes (see Supplemental Data Set 2A online). The inefficient splicing of some of these genes, including *ABNORMAL SUSPENSOR1/DICER-LIKE1* (*ASU1/DCL1*), *OLIGOCELLULA2* (*OLI2*), *EMBRYO DEFECTIVE 2785* (*EMB2785*), *EMBRYO DEFECTIVE 2016* (*EMB2016*), and *GLUCURONOX- YLAN GLUCURONOSYLTRANSFERASE* (*GUT2*), in the absence of LSM8 was confirmed by RT-PCR analysis with appropriate primers (Figure 9C). As expected, the splicing of other developmental-related genes, such as *AINTEGUMENTA* (*ANT*), was not affected (Figure 9C). These findings indicate that the *Arabidopsis* LSM2-8 nuclear complex ensures the accurate splicing of specific development-related mRNAs, allowing correct developmental gene expression.

DISCUSSION

Although LSM-related proteins have been found in the genomes of different plant species (Proost et al., 2009; Goodstein et al., 2012), they have not yet been biochemically characterized and their function in RNA metabolism remained to be established. In this study, we used genetic, molecular, cell biology, and biochemical studies to demonstrate that *Arabidopsis* LSMs are organized in two heptameric complexes. More importantly, our results reveal that these complexes are essential for normal *Arabidopsis* development, and this role seems to be performed by controlling the proper turnover and splicing of selected developmental-related mRNAs that, in turn, ensures the appropriate gene expression during plant development.

Subcellular localization and BiFC experiments strongly support the idea that *Arabidopsis* LSM proteins assemble into two heteroheptameric complexes that differ by a single subunit, LSM1A/B or LSM8, and localize in cytoplasm (LSM1-7) and nucleus (LSM2-8). First, in *Arabidopsis*, as in other eukaryotes (Beggs, 2005), LSM1 proteins (LSM1A and LSM1B) specifically accumulate in the cytoplasm, while LSM8 has a nuclear localization and the rest of LSM proteins are simultaneously localized in cytoplasm and nucleus. Second, *Arabidopsis* LSM proteins do not interact promiscuously with each other. Instead, each LSM specifically interacts with two other LSM proteins following the same pattern of interaction as in the yeast and human heptameric complexes (Beggs, 2005). Consistent with their different subcellular localization and with the assumption that they define the two *Arabidopsis* LSM complexes, LSM1 and LSM8 proteins do not interact with each other. Moreover, while all

interactions involving LSM1 proteins take place in the cytoplasm, those involving LSM8 occur in the nucleus and those involving LSM2-7 proteins occur simultaneously in both subcellular compartments. Third, LSM1 and LSM8 proteins are required for the formation of the *Arabidopsis* cytoplasmic and nuclear LSM complexes, respectively.

Our genetic and molecular analyses allowed us to establish the function of *Arabidopsis* LSM complexes. In *Arabidopsis* plants deficient in LSM1 proteins, several transcripts accumulate in their capped forms and show a reduced degradation rate with the corresponding increase in their half-lives, indicating that the *Arabidopsis* LSM1-7 complex function in the 5' to 3' pathway of mRNA decay as an activator of decapping. As expected from their high amino acid identity (80%), LSM1A and LSM1B are functionally redundant. *lsm1a* and *lsm1b* single null mutants are not perturbed in mRNA decapping and decay, and LSM1A and LSM1B, individually, are able to complement the alterations in mRNA decapping and decay displayed by the *lsm1a lsm1b* double mutant. On the other hand, *Arabidopsis* plants lacking LSM8 are affected in the stability of the spliceosomal U6 snRNA which, accordingly, results in pre-mRNA splicing defects. Compared with the wild type, at least 469 intron retention events distributed among 453 genes were detected in the *lsm8-1* mutant under our experimental conditions, demonstrating that the LSM2-8 complex regulates genome-wide pre-mRNA splicing. Although intron retention constitutes the most frequent splicing defect in plant genes (Syed et al., 2012), it is probable that other mRNA splicing defects, including exon skipping, alternative 5' splicing, and alternative 3' splicing, also occur in the absence of LSM8. Unfortunately, however, the detection of these defects is unreliable when using tiling arrays to analyze pre-mRNA splicing at global level (Ner-Gaon and Fluhr, 2006). The existence of splicing defects has also been reported in some genes of plants harboring a postembryonic lethal mutation in *LSM4* (Zhang et al., 2011). Nonetheless, only one of these genes (*AT1G28060*) has been found in our tiling analysis of the *lsm8-1* mutant, in all likelihood because of the plants used being at different developmental stages and the different methods of analysis being used. Furthermore, only a few genes were analyzed for splicing defects in the *lsm4* mutant (Zhang et al., 2011). The fact that not all mRNAs exhibit reduced degradation rates in *lsm1a lsm1b* plants nor splicing defects in *lsm8* mutants indicates that the cytoplasmic and nuclear LSM complexes from *Arabidopsis*, as described for other components of the *Arabidopsis* machineries involved in mRNA degradation and processing (Xu et al., 2006; Goeres et al., 2007; Xu and Chua, 2009; Kim et al., 2010; Rymarquis et al., 2011), act on selected targets. How selected mRNAs are targeted to these complexes remains largely unknown. According to their relevant function in mRNA decapping and degradation, the lack of LSM1 proteins has a deep impact on *Arabidopsis* gene expression, the levels of more than 600 transcripts being significantly altered, 358 increased and 316 reduced, in *lsm1a lsm1b* plants. Similarly, the expression of at least 250 genes is significantly affected in null mutants for *LSM8*. Consistent with the implication of *Arabidopsis* LSM8 in pre-mRNA splicing, in this case the number of downregulated (193) genes is much higher than that of upregulated (65) ones. These data indicate that, like other factors involved in the

Arabidopsis decapping 5' to 3' decay pathway, including DCP2, DCP5, and XRN4, or in pre-mRNA splicing, such as STABILIZED1 (STA1) (Lee et al., 2006; Xu et al., 2006; Goeres et al., 2007; Xu and Chua, 2009; Rymarquis et al., 2011), the *Arabidopsis* LSM1-7 and LSM2-8 complexes also play a major role in maintaining appropriate levels of gene expression. Interestingly, however, the result of the absence of these factors on *Arabidopsis* gene expression seems to be highly specific.

In eukaryotic cells, P-bodies appear as cytoplasmic foci containing RNP complexes associated with translational repression, mRNA storage, and cytoplasmic mRNA decay pathways (Xu and Chua, 2011). Under conditions promoting high levels of mRNA turnover, such as osmotic, hypoxic, or heat stress conditions, P-bodies increase in number and size, becoming more apparent (Teixeira et al., 2005; Weber et al., 2008). Nevertheless, it is not yet clear how P-bodies are formed and what their function is in eukaryotic cells. Human LSM4 localizes in P-bodies and loses this localization when mutations are introduced in residues involved in interacting with other LSM proteins (Ingelfinger et al., 2002). In yeast, LSM2 and LSM7 fail to localize to P-bodies in LSM1-deficient cells (Tharun et al., 2005), and it has been shown that LSM4 plays a role in the localization of the LSM1-7 complex in P-bodies and in P-body assembly (Decker et al., 2007; Reijns et al., 2008). Our findings demonstrate that the *Arabidopsis* LSM1-7 complex not only accumulates in P-bodies, which is consistent with its function in cytoplasmic mRNA decapping and decay but is also essential for their formation. As expected from its specific nuclear localization, LSM8 does not localize in P-bodies. The implication of *Arabidopsis* LSM2-LSM7 proteins in P-body formation is difficult to assess due to the absence of viable *lsm2-lsm7* null mutants (see below). To date, only few proteins have been related with P-bodies in plants, including DCP5, an *Arabidopsis* protein indirectly implicated in regulating mRNA decapping that has a function in P-body formation (Xu and Chua, 2009), and DCP1, DCP2, and VCS, three proteins that constitute a decapping complex and colocalize with P-bodies in *Arabidopsis* (Xu et al., 2006; Goeres et al., 2007). In addition, *Arabidopsis* proteins XRN4, *ARABIDOPSIS THALIANA* TANDEM ZINC FINGER PROTEIN1, and POLYPYRIMIDINE TRACT BINDING PROTEINS have also been found in plant P-bodies (Weber et al., 2008; Pomeranz et al., 2010; Stauffer et al., 2010). The identification of additional P-body components will certainly help to understand how they are formed and what their function is in plant cells.

It has been described that the proteins involved in mRNA decapping, DCP1, DCP2, VCS, and DCP5, as well as the splicing factors STA1, U11/U112-31K, and ERECTA MRNA UNDER-EXPRESSED, play an essential role in *Arabidopsis* development, their absence being lethal (Lee et al., 2006; Xu et al., 2006; Goeres et al., 2007; Xu and Chua, 2009; Furumizu et al., 2010; Kim et al., 2010). *Arabidopsis* plants deficient in LSM1 and LSM8 proteins also display quite severe development alterations, but they are viable. *lsm1a lsm1b* and *lsm8* mutants are affected in both vegetative and reproductive developmental traits, indicating that cytoplasmic and nuclear LSM complexes are required for the normal development of *Arabidopsis* throughout the different phases of its life cycle. Nevertheless, consistent with

the different function of the two LSM complexes, the phenotypes exhibited by *lsm1a lsm1b* and *lsm8* mutants are different. Recently, T-DNA insertional mutations for *LSM4* and *LSM7* have been described to show postembryonic and embryonic lethality, respectively (Zhang et al., 2011; <http://www.seedgenes.org/>). We have observed the same lethal phenotype not only for the *lsm4* and *lsm7* null mutations but also for the *lsm3a lsm3b* and *lsm6a lsm6b* doubles, with the corresponding single mutants exhibiting wild-type phenotypes, as well as for the *lsm1a lsm1b lsm8* triple mutations (C. Perea-Resa, T. Hernández-Verdeja, and J. Salinas, unpublished data). Moreover, we have not found any insertion abolishing the expression of *LSM2* and *LSM5* genes in the available T-DNA collections, which suggests that, probably, *lsm2* and *lsm5* null mutations are also lethal. However, weak mutant alleles for these genes do not appear to be lethal. In fact, a point mutation in *LSM5* (*sad1*) that causes the conversion of a Glu residue to a Lys makes mutant plants much smaller than the wild type but does not result in lethality (Xiong et al., 2001). Altogether, these data indicate that the presence of at least one LSM complex is essential in *Arabidopsis*. In yeast, it has been proposed that LSM2-7 proteins might associate, in the apparent absence of LSM1 or LSM8, with other proteins, including related SM proteins, to form complexes that would remain at least partially active (Beggs, 2005). We cannot exclude that this could be the case in *lsm1a lsm1b* and *lsm8* mutants. Further studies are required to understand how *Arabidopsis* can develop and reproduce with just one LSM complex.

The results presented in this work demonstrate that post-transcriptional regulation has an important role in controlling gene expression related to plant development. In fact, we show that several selected genes involved in both vegetative and reproductive development are targets of the *Arabidopsis* LSM complexes. Thus, the LSM1-7 cytoplasmic complex ensures the precise half-life of the transcripts corresponding to its targets, for instance, *UGT87A2* (floral transition), *MEE14* (embryo development), or *YLS9* (leaf development), and, consequently, their adequate temporal expression patterns. The LSM2-8 nuclear complex, in turn, guarantees the correct splicing of its targets, such as *ASU1/DCL1* (flower development), *OLI2* (leaf development), or *EMB2785* (embryo development) and, therefore, the accurate translation of the corresponding transcripts. Furthermore, we also show that, consistent with their role in turnover and splicing of development-related mRNAs, the *Arabidopsis* LSM complexes regulate the expression levels of many genes that are implicated in different developmental processes, including seed germination, root development, leaf development, floral transition, flower development, and embryogenesis. In particular, the expression levels of 72 and 67 specific genes involved in development were found to be altered in *lsm1a lsm1b* and *lsm8-1* mutants, respectively. However, it is obvious that these numbers should be considerably higher taking into account that only plants from one developmental stage (2 weeks old) were analyzed by microarray experiments. We propose that the cumulative defects in gene expression are responsible for the abnormal developmental phenotypes observed in these plants.

In conclusion, the findings presented here reveal the organization and function of *Arabidopsis* LSM proteins and demonstrate that these proteins are crucial for plant growth and

development. Understanding the molecular mechanisms that regulate the function of LSMs and confer their target specificity constitutes an interesting challenge for the future.

METHODS

Plant Material, Constructs, and Growth Conditions

Arabidopsis thaliana Col-0 ecotype and mutants *lsm8-1* (Salk-025064) and *lsm8-2* (Salk-048010) were obtained from the Nottingham Arabidopsis Stock Center. Mutant *lsm1b* is a Gabi-kat line from Max Planck Institute (GK 391E05). *Arabidopsis* No-0 ecotype and mutant *lsm1a* (12-2253-1) were obtained from Riken Institute. *lsm1a* is a Ds transposon insertion line in the No-0 background. *lsm1a* and *lsm1b* single mutants were crossed to generate a *lsm1a lsm1b* double mutant that was subsequently backcrossed four times with Col-0 to have both mutations within this genetic background. Transgenic Col-0 plants containing the 35S-GFP-DCP2 and 35S-GFP-VCS constructs (Goeres et al., 2007) were kindly provided by Leslie Sieburth (University of Utah, Salt Lake City, UT). These plants were crossed with *lsm1a lsm1b* to obtain double mutants with the 35S-GFP-DCP2 and 35S-GFP-VCS constructs in homozygosis. All mutant and transgenic lines were genotyped using the primers listed in Supplemental Data Set 2D online.

To obtain the *LSMs_{pro}*-GUS fusions, at least 1-kb promoter fragment from each of the 11 *Arabidopsis* LSM genes was cloned into the pBI101 binary vector (Clontech). For the *LSMs_{pro}*-LSM-GFP fusions, genomic regions containing the *LSM1A*, *LSM1B*, *LSM3A*, *LSM3B*, *LSM4*, and *LSM8* genes, including at least 1 kb of the corresponding promoters, were cloned into the pGWB4 gateway binary vector (Nakagawa et al., 2007). All fusions were verified by sequencing and introduced in Col-0 via *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 using the floral dip method (Clough and Bent, 1998). Fusions *LSM1A_{pro}*-LSM1A-GFP, *LSM1B_{pro}*-LSM1B-GFP, and *LSM8_{pro}*-LSM8-GFP were also introduced in *lsm1a lsm1b* and *lsm8-1* mutants. Similarly, the *LSM4_{pro}*-LSM4-GFP fusion was used to transform *lsm1a lsm1b* and *lsm8-1* mutants. Finally, the fusion 35S-RFP-DCP1 (Weber et al., 2008), kindly provided by Markus Fauth (Johann Wolfgang Goethe-University Frankfurt, Germany), was introduced in transgenic lines containing *LSM1A_{pro}*-LSM1A-GFP or *LSM1B_{pro}*-LSM1B-GFP. All transgenic lines were genetically determined to have the constructs integrated at a single locus in homozygosis. For BiFC assays, full-length cDNAs corresponding to the 11 LSM genes were amplified with appropriate primers (see Supplemental Data Set 2D online) to incorporate convenient restriction sites at their 5' and 3' ends. Fragments were cloned into the pSPYNE-35S and pSPYCE-35S binary vectors (Walter et al., 2004), kindly provided by Jörg Kudla (Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Germany), sequenced, and introduced in *Agrobacterium* C58C1 for subsequent agroinfiltration. Agroinfiltration was performed in leaves from 3-week-old plants of *Nicotiana benthamiana* grown at 25°C, essentially as described (English et al., 1997), without using a silencing suppressor. The expression of fusion proteins was subsequently assayed 3 d after agroinfiltration.

Plants were grown at 20°C under long-day photoperiods (16 h of cool-white fluorescent light, photon flux of 90 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) in pots containing a mixture of organic substrate and vermiculite (3:1 [v/v]) or in Petri dishes containing Murashige and Skoog medium supplemented with 1% Suc and solidified with 0.8% (w/v) agar. Plants used to estimate flowering time in short-day conditions were grown under an 8-h light regime.

Gene Expression Analysis

Total RNA was extracted using the Purezol reagent (Bio-Rad) according to the manufacturer's protocol. RNA samples were treated with DNase I (Roche) and quantified with a Nanodrop spectrophotometer (Thermo

Scientific). RNA blot hybridizations were performed according to standard procedures. Specific probes were obtained by PCR with the primers described in Supplemental Data Set 2D online and labeled with [α - 32 P] dCTP using the Megaprime DNA labeling systems kit (GE Healthcare). Equal RNA loading in the experiments was monitored by *rRNA* staining. RNA samples for each experiment were analyzed in at least three independent blots, and each experiment was repeated at least twice. For real-time RT-PCRs, cDNAs were prepared with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad) and then amplified using the Bio-Rad iQ2 thermal cycler, the SsoFast EvaGreen Supermix (Bio-Rad), and gene-specific primers (see Supplemental Data Set 2D online). The relative expression values were determined using the *AT4G24610* gene as a reference (Czechowski et al., 2005). All reactions were realized in triplicate employing three independent RNA samples.

Determination of GUS Activity

GUS activity in *Arabidopsis* transgenic plants containing the fusion *LSMs_{pro}-GUS* was detected and measured as previously described (Medina et al., 2001).

Microscopy Analysis

Subcellular localization of fusion proteins in transgenic *Arabidopsis* was performed in roots from 6-d-old seedlings grown in vertical position on Murashige and Skoog medium supplemented with 1% Suc and solidified with 0.8% (w/v) agar. Heat treatment was performed by transferring seedlings to 37°C for 2 h. Treatment with cycloheximide was performed by incubating seedlings in liquid Murashige and Skoog medium supplemented with 200 μ g/mL of cycloheximide for 2 h at 37°C. Transient expression of fusion proteins in leaves of 3-week-old plants of *N. benthamiana* was assayed 3 d after agroinfiltration as described above. Microscopy images were collected using a TCS SP2 confocal laser spectral microscope (Leica Microsystems). The excitation lines for imaging GFP and RFP fusions were 488 and 561 nm, respectively.

Cordycepin Treatments, mRNA Half-Life Estimations, and Capped mRNA Analysis

Six-day-old seedlings and 2-week-old plants were used for cordycepin treatment, essentially as described (Gutiérrez et al., 2002). Samples were collected at the indicated time points, and total RNA was extracted using the Purezol reagent (Bio-Rad). Gene expression was analyzed by RNA blot hybridizations or real-time RT-PCR as described above. To examine U6 snRNA, U3 snoRNA, and U4 snRNA decay, additional cordycepin was added to the samples at 9 and 24 h to ensure transcriptional repression. For graphical representation of mRNA stability and mRNA half-life estimation, the hybridization bands were quantified with the ImageJ software (NIH), and values were normalized to wild-type time 0.

To determine if accumulating mRNAs were capped, RNA ligase-mediated RACE was performed using the First Choice RLM-RACE kit (Ambion) following the manufacturer's specifications. RNAs were extracted from 6-d-old seedlings or 2-week-old plants with the RNeasy kit (Qiagen), and PCRs were performed using a low (20 to 25) or high (30 to 32) number of cycles. Specific primers for the 5' RACE adapter and for the genes tested are described in Supplemental Data Set 2D online.

Microarray Analysis

Total RNA from 2-week-old Col-0, *lsm1a lsm1b*, and *lsm8-1* plants was extracted using the RNeasy kit (Qiagen), and three biological replicates were independently hybridized per transcriptomic comparison. For microarray analysis of the *lsm1a lsm1b* mutant, RNA amplification and

labeling were performed basically as described (Goda et al., 2008). Hybridization was performed on Agilent *Arabidopsis* Oligo Microarrays v4 (catalog number G2519F-V4021169) in accordance with the manufacturer's specifications. The statistical significance of the results was evaluated with FIESTA software (<http://bioinfogp.cnb.csic.es>). Genes with an false discovery rate-corrected P value lower than 0.05 and a fold change of more or less than 2 were selected for consideration. Data from these microarray experiments have been deposited in the Gene Expression Omnibus database under accession number GSE39630.

For microarray analysis of the *lsm8-1* mutant, double-stranded cDNAs were synthesized, processed, and labeled with the GeneChip whole-transcript double-stranded target assay kit (Affymetrix) following the manufacturer's instructions. Labeled cDNAs were used to hybridize Affymetrix *Arabidopsis* Tiling 1.0R arrays (catalog number 900594). Data were analyzed with Tiling Analysis Software from Affymetrix using TAIR7 as reference annotation (BPMAP file). To detect altered gene expression, genes with at least one exon identified as significantly over- or under-expressed (P value lower than 0.05 and a fold change of more or less than 2) were considered. A gene was accepted as differentially expressed when the 10% trimmed mean of the signals of all probes in its exons and UTRs was at least twofold higher or lower in the mutant than in the wild type. For those genes with splicing variants, only the constitutive exons were considered. Similarly, introns with significantly higher signals in the mutant than in the wild type were initially considered to be intron retention events. For high confidence, only the introns covered with a minimum of three probes and average signals over twofold were selected (see Supplemental Data Set 2A online). Data from these microarray experiments have been deposited in the Gene Expression Omnibus database under accession number GSE39617.

Intron Retention Analysis

Total RNA from 2-week-old plants was extracted with Purezol (Bio-Rad) and used for cDNAs generation with the iScript cDNA synthesis kit (Bio-Rad). Intron retention was revealed by RT-PCR using a pair of specific primers for each gene tested (see Supplemental Data Set 2D online). One primer was situated inside the retained intron and the second one in an adjacent exon. All PCR reactions were performed using RNA with (+RT) or without (−RT) reverse transcriptase to detect genomic DNA contaminations. Genomic DNA was included in all reactions as a positive control, and *TUBULIN* expression level was used as a loading control.

Accession Numbers

Sequence data from this article can be found in the Arabidopsis Genome Initiative or GenBank/EMBL data libraries under the accession numbers listed in Supplemental Data Set 2E online. The microarray data were submitted to the Gene Expression Omnibus site (www.ncbi.nlm.nih.gov/geo) under accession numbers GSE39630 and GSE39617.

Supplemental Data

The following materials are available in the online version of this article.

Supplemental Figure 1. Sequence Alignment of *Arabidopsis* LSM Proteins.

Supplemental Figure 2. Phylogenetic Analysis of Plant LSM Proteins.

Supplemental Figure 3. Expression Patterns of *LSM1A* and *LSM1B* Genes.

Supplemental Figure 4. Visualization of in Vivo Interactions between *Arabidopsis* LSM Proteins by BIFC Assays.

Supplemental Figure 5. Phenotypic Analysis of *lsm1a* and *lsm1b* Single Mutants.

Supplemental Figure 6. Quantification of Developmental Phenotypes Shown by *lsm* Mutants.

Supplemental Figure 7. Complementation of the *lsm1a lsm1b* Double Mutant by LSM1B.

Supplemental Figure 8. mRNA Stability and Accumulation of Capped Transcripts in *c-lsm1b*, *lsm1a*, *lsm1b*, and *lsm8-1* Plants.

Supplemental Figure 9. Tiling Array Hybridization Signals in Representative Genes Showing Intron Retention Events in the *lsm8-1* Mutant.

Supplemental Figure 10. Stability of U6 snRNA in the *lsm1a lsm1b* Double Mutant.

Supplemental Data Set 1. Text File of the Alignment Used for the Phylogenetic Analysis Shown in Supplemental Figure 2.

Supplemental Data Set 2A. Intron Retention Events in the *lsm8-1* Mutant.

Supplemental Data Set 2B. Genes Whose Expression Is Up- or Downregulated in the *lsm1a lsm1b* Double Mutant.

Supplemental Data Set 2C. Genes Whose Expression Is Up- or Downregulated in the *lsm8-1* Mutant.

Supplemental Data Set 2D. Oligonucleotide Sequences of Primers Used in This Study.

Supplemental Data Set 2E. Accession Numbers of the Sequence Data Presented in This Study.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Markus Fauth for the 35S-RFP-DCP1 fusion, Leslie Sieburth for the transgenic plants containing the fusions 35S-GFP-DCP2 and 35S-GFP-VCS, Jörg Kudla for the pSPYNE-35S and pSPYCE-35S vectors, Jose Manuel Franco, Javier Forment and Pablo Gonzalez-Garcia for tiling array data analysis, and Jose Antonio Jarillo and Roberto Solano for discussions and comments. This work was supported by grants CSD2007-00057, EU2009-04074, and BIO2010-17545 from the Spanish Secretary of Research, Development, and Innovation.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

C.P.-R. and T.H.-V. designed the research, performed research, and analyzed data. R.L.-C. and M.M.C. performed research. J.S. designed the research, analyzed data, and wrote the article.

Received August 3, 2012; revised October 31, 2012; accepted November 13, 2012; published December 7, 2012.

REFERENCES

- Anderson, J.S.J., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* **17**: 1497–1506.
- Barta, A., Kalyna, M., and Lorković, Z.J. (2008). Plant SR proteins and their functions. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **326**: 83–102.

- Beelman, C.A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrande, T.E., Hatfield, L., Fortner, D.M., and Parker, R. (1996). An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature* **382**: 642–646.
- Beggs, J.D. (2005). Lsm proteins and RNA processing. *Biochem. Soc. Trans.* **33**: 433–438.
- Belostotsky, D.A., and Sieburth, L.E. (2009). Kill the messenger: mRNA decay and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**: 96–102.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell* **125**: 1111–1124.
- Bonnerot, C., Boeck, R., and Lapeyre, B. (2000). The two proteins Pat1p (Mrt1p) and Spb8p interact in vivo, are required for mRNA decay, and are functionally linked to Pab1p. *Mol. Cell. Biol.* **20**: 5939–5946.
- Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M., and Séraphin, B. (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* **19**: 1661–1671.
- Bregues, M., Teixeira, D., and Parker, R. (2005). Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science* **310**: 486–489.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**: 735–743.
- Coller, J., and Parker, R. (2005). General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell* **122**: 875–886.
- Coller, J.M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., and Parker, R. (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA* **7**: 1717–1727.
- Cougot, N., Babajko, S., and Séraphin, B. (2004). Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J. Cell Biol.* **165**: 31–40.
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M.K., and Scheible, W.R. (2005). Genome-wide identification and testing of superior reference genes for transcript normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **139**: 5–17.
- Decker, C.J., Teixeira, D., and Parker, R. (2007). Edc3p and a glutamine/asparagine-rich domain of Lsm4p function in processing body assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **179**: 437–449.
- Deng, X., Gu, L., Liu, C., Lu, T., Lu, F., Lu, Z., Cui, P., Pei, Y., Wang, B., Hu, S., and Cao, X. (2010). Arginine methylation mediated by the *Arabidopsis* homolog of PRMT5 is essential for proper pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**: 19114–19119.
- Dunkley, T., and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* **18**: 5411–5422.
- English, J., Davenport, G., Elmayan, T., Vaucheret, H., and Baulcombe, D. (1997). Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J.* **12**: 597–603.
- Furumizu, C., Tsukaya, H., and Komeda, Y. (2010). Characterization of EMU, the *Arabidopsis* homolog of the yeast THO complex member HPR1. *RNA* **16**: 1809–1817.
- Goda, H., et al. (2008). The AtGenExpress hormone and chemical treatment data set: Experimental design, data evaluation, model data analysis and data access. *Plant J.* **55**: 526–542.
- Goeres, D.C., Van Norman, J.M., Zhang, W., Fauver, N.A., Spencer, M.L., and Sieburth, L.E. (2007). Components of the *Arabidopsis* mRNA decapping complex are required for early seedling development. *Plant Cell* **19**: 1549–1564.
- Goodstein, D.M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R.D., Fazo, J., Mitros, T., Dirks, W., Hellsten, U., Putnam, N., and

- Rokhsar, D.S.** (2012). Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* **40**(Database issue): D1178–D1186.
- Gutiérrez, R.A., Ewing, R.M., Cherry, J.M., and Green, P.J.** (2002). Identification of unstable transcripts in *Arabidopsis* by cDNA microarray analysis: Rapid decay is associated with a group of touch- and specific clock-controlled genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 11513–11518.
- Halbeisen, R.E., Galgano, A., Scherrer, T., and Gerber, A.P.** (2008). Post-transcriptional gene regulation: From genome-wide studies to principles. *Cell. Mol. Life Sci.* **65**: 798–813.
- Hu, C.D., Chinenov, Y., and Kerppola, T.K.** (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol. Cell* **9**: 789–798.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D.J., Lüthmann, R., and Achsel, T.** (2002). The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA* **8**: 1489–1501.
- Kastenmayer, J.P., and Green, P.J.** (2000). Novel features of the XRN-family in *Arabidopsis*: evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 13985–13990.
- Kim, W.Y., Jung, H.J., Kwak, K.J., Kim, M.K., Oh, S.H., Han, Y.S., and Kang, H.** (2010). The *Arabidopsis* U12-type spliceosomal protein U11/U12-31K is involved in U12 intron splicing via RNA chaperone activity and affects plant development. *Plant Cell* **22**: 3951–3962.
- Lange, H., and Gagliardi, D.** (2010). The exosome and 3'-5' RNA degradation in plants. *Adv. Exp. Med. Biol.* **702**: 50–62.
- Laubinger, S., Zeller, G., Henz, S.R., Sachsenberg, T., Widmer, C.K., Naouar, N., Vuylsteke, M., Schölkopf, B., Ratsch, G., and Weigel, D.** (2008). At-TAX: A whole genome tiling array resource for developmental expression analysis and transcript identification in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biol.* **9**: R112.
- Lee, B.H., Kapoor, A., Zhu, J., and Zhu, J.K.** (2006). STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**: 1736–1749.
- Lorković, Z.J.** (2009). Role of plant RNA-binding proteins in development, stress response and genome organization. *Trends Plant Sci.* **14**: 229–236.
- Lorković, Z.J., Wicczorek, K., Kirk, D.A., Lambermon, M.H., and Filipowicz, W.** (2000). Pre-mRNA splicing in higher plants. *Trends Plant Sci.* **5**: 160–167.
- Matlin, A.J., Clark, F., and Smith, C.W.** (2005). Understanding alternative splicing: Towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**: 386–398.
- Medina, J., Catalá, R., and Salinas, J.** (2001). Developmental and stress regulation of RC12A and RC12B, two cold-inducible genes of *Arabidopsis* encoding highly conserved hydrophobic proteins. *Plant Physiol.* **125**: 1655–1666.
- Meyer, S., Temme, C., and Wahle, E.** (2004). Messenger RNA turnover in eukaryotes: Pathways and enzymes. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **39**: 197–216.
- Nakagawa, T., Kurose, T., Hino, T., Tanaka, K., Kawamukai, M., Niwa, Y., Toyooka, K., Matsuoka, K., Jinbo, T., and Kimura, T.** (2007). Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation. *J. Biosci. Bioeng.* **104**: 34–41.
- Ner-Gaon, H., and Fluhr, R.** (2006). Whole-genome microarray in *Arabidopsis* facilitates global analysis of retained introns. *DNA Res.* **13**: 111–121.
- Parker, R., and Song, H.** (2004). The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**: 121–127.
- Pomeranz, M., Lin, P.C., Finer, J., and Jang, J.C.** (2010). AtTZF gene family localizes to cytoplasmic foci. *Plant Signal. Behav.* **5**: 190–192.
- Proost, S., Van Bel, M., Sterck, L., Billiau, K., Van Parys, T., Van de Peer, Y., and Vandepoele, K.** (2009). PLAZA: A comparative genomics resource to study gene and genome evolution in plants. *Plant Cell* **21**: 3718–3731.
- Raab, S., and Hoth, S.** (2007). A mutation in the AtPRP4 splicing factor gene suppresses seed development in *Arabidopsis*. *Plant Biol. (Stuttg.)* **9**: 447–452.
- Reddy, A.S.** (2001). Nuclear pre-mRNA splicing in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* **20**: 523–571.
- Reijns, M.A., Alexander, R.D., Spiller, M.P., and Beggs, J.D.** (2008). A role for Q/N-rich aggregation-prone regions in P-body localization. *J. Cell Sci.* **121**: 2463–2472.
- Rymarquis, L.A., Souret, F.F., and Green, P.J.** (2011). Evidence that XRN4, an *Arabidopsis* homolog of exoribonuclease XRN1, preferentially impacts transcripts with certain sequences or in particular functional categories. *RNA* **17**: 501–511.
- Sheth, U., and Parker, R.** (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science* **300**: 805–808.
- Sheth, U., and Parker, R.** (2006). Targeting of aberrant mRNAs to cytoplasmic processing bodies. *Cell* **125**: 1095–1109.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P., and Green, P.J.** (2004). AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell* **15**: 173–183.
- Stauffer, E., Westermann, A., Wagner, G., and Wachter, A.** (2010). Polypyrimidine tract-binding protein homologues from *Arabidopsis* underlie regulatory circuits based on alternative splicing and downstream control. *Plant J.* **64**: 243–255.
- Syed, N.H., Kalyna, M., Marquez, Y., Barta, A., and Brown, J.W.** (2012). Alternative splicing in plants - Coming of age. *Trends Plant Sci.* **17**: 616–623.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., and Parker, R.** (2005). Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* **11**: 371–382.
- Tharun, S.** (2009). Roles of eukaryotic Lsm proteins in the regulation of mRNA function. *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **272**: 149–189.
- Tharun, S., He, W., Mayes, A.E., Lennertz, P., Beggs, J.D., and Parker, R.** (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* **404**: 515–518.
- Tharun, S., Muhrad, D., Chowdhury, A., and Parker, R.** (2005). Mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* LSM1 gene that affect mRNA decapping and 3' end protection. *Genetics* **170**: 33–46.
- Unterholzner, L., and Izaurralde, E.** (2004). SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol. Cell* **16**: 587–596.
- Wahl, M.C., Will, C.L., and Lüthmann, R.** (2009). The spliceosome: Design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136**: 701–718.
- Walter, M., Chaban, C., Schütze, K., Batistic, O., Weckermann, K., Näke, C., Blazevic, D., Grefen, C., Schumacher, K., Oecking, C., Harter, K., and Kudla, J.** (2004). Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation. *Plant J.* **40**: 428–438.
- Wang, B.B., and Brendel, V.** (2004). The ASRG database: Identification and survey of *Arabidopsis thaliana* genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biol.* **5**: R102.
- Weber, C., Nover, L., and Fauth, M.** (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.* **56**: 517–530.

- Xiong, L., Gong, Z., Rock, C.D., Subramanian, S., Guo, Y., Xu, W., Galbraith, D., and Zhu, J.K. (2001). Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* **1**: 771–781.
- Xu, J., and Chua, N.H. (2009). *Arabidopsis* decapping 5 is required for mRNA decapping, P-body formation, and translational repression during postembryonic development. *Plant Cell* **21**: 3270–3279.
- Xu, J., and Chua, N.H. (2011). Processing bodies and plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **14**: 88–93.
- Xu, J., Yang, J.Y., Niu, Q.W., and Chua, N.H. (2006). *Arabidopsis* DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell* **18**: 3386–3398.
- Zhang, Z., et al. (2011). *Arabidopsis* floral initiator SKB1 confers high salt tolerance by regulating transcription and pre-mRNA splicing through altering histone H4R3 and small nuclear ribonucleoprotein LSM4 methylation. *Plant Cell* **23**: 396–411.

9. ANEXO III: ABSTRACT

IDENTIFICATION AND FUNCTIONAL CHARACTERIZATION OF *Arabidopsis thaliana* NUCLEAR LSM PROTEIN COMPLEX IN COLD ACCLIMATION RESPONSE

INTRODUCTION

Living organisms are exposed to changes in their environment that can affect their development and reproduction. Plants, as sessile organisms, have developed mechanisms to cope with unfavorable environmental alterations. Low temperatures are among the factors that constraint their geographical distribution and can cause great economic losses. Species from temperate regions have evolved an adaptive response, named **cold acclimation**, so they can increase their constitutive freezing tolerance after exposure to low, nonfreezing temperatures (Levitt, 1980).

Cold acclimation is a complex process during which many molecular and physiological changes take place, such as alterations in lipid composition, and increase in cytosolic calcium, abscisic acid (ABA), sugars and other osmolytes, among others (Salinas, 2002; Theocharis y col., 2012). In a general and simply way, the adaptive process begins with the sensing of low temperature by unknown receptors that transmit the signal inside the cell (Knight y Knight, 2012). In the cytoplasm, the signal is transduced and activates transcriptional factors that control gene expression (Huang y col., 2012). The cold-regulated gene products, in a direct or indirect way, control the physiological changes that allow plants to increase freezing tolerance (Theocharis y col., 2012). Changes in gene expression are one of the mayor alterations that take place during cold acclimation, and much research has been conducted to elucidate how they are controled. Although cold-regulated gene expression is tightly regulated at the transcriptional level, recent works have revealed that it is also under post-transcriptional, translational and post-translational control (Viswanathan y Zhu, 2002; Barrero-Gil y Salinas, 2013).

The **SM-LIKE (LSM)** proteins constitute a large family of proteins involved in multiple aspects of RNA metabolism. In humans and yeast, there are eight highly conserved LSM proteins (LSM1 to LSM8) that form two different heptameric ring complexes, LSM1-LSM7 and LSM2-LSM8, localized in the cytoplasm and nucleus, respectively. LSM1 and LSM8 define and confer specificity to each complex, while the other LSM proteins (LSM2 to LSM7) participates in both cytoplasmic and nuclear complexes (Beggs, 2005). The LSM1-LSM7 cytoplasmic complex binds to oligoadenylated mRNAs, promoting their degradation. The **LSM2-LSM8 nuclear complex** binds to and stabilizes the U6 small nuclear RNA (U6 snRNA) in order to build the U6 small nuclear ribonucleoprotein (U6 snRNP) and the core of the spliceosome, and functions in **pre-mRNA splicing** (Beggs, 2005). *In silico* studies identified potential homologs for all the LSM proteins in *Arabidopsis*, three of them being duplicated (LSM1, LSM3 and LSM6) (Wang y Brendel, 2004). To date,

however, plant LSMs have not been functionally characterized, and their role in RNA metabolism remains to be elucidated. Only Arabidopsis *LSM5* and *LSM4* genes have been experimentally studied, both of them being related to abscisic acid and osmotic stress signaling (Xiong et al., 2001b; Zhang et al., 2011).

Previous work in our laboratory isolated a novel cold-inducible gene, *RCI6*, encoding a yeast and human LSM2 homolog. Besides *RCI6/LSM2*, all Arabidopsis *LSM* genes are cold-inducible suggesting a function of LSM complexes in the regulation of cold acclimation in Arabidopsis. Therefore, the main objectives of this work were:

- The functional characterization of Arabidopsis LSM2-LSM8 complex
- The elucidation of the role of Arabidopsis LSM2-LSM8 complex in cold acclimation

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, we used genetic, molecular, cell biology and biochemical studies to demonstrate that Arabidopsis LSM2-LSM8 proteins are organized in nuclear complexes that stabilize U6 snRNA and control pre-mRNA splicing. The LSM2-LSM8 nuclear complex is necessary for normal Arabidopsis development and, more important, it is a negative regulator of cold acclimation. These roles seem to be performed by controlling the proper splicing of selected mRNAs that, in turn, ensure the appropriate gene expression during development and cold acclimation.

Sequence comparisons and motif searches allowed the identification of 11 genes in the Arabidopsis genome encoding proteins related to the eight LSM proteins that in yeast and animals constitute the heptameric LSM complexes, LSM1-LSM7 and LSM2-LSM8, with three of them being duplicated (LSM1, LSM3 and LSM6) (Wang et al., 2004). The predicted Arabidopsis proteins contain the Sm1 and Sm2 motifs separated by a nonconserved linker region of variable length that conform the SM domain typical of LSM proteins. Phylogenetic analysis of LSM proteins from Arabidopsis and other model organisms confirmed that Arabidopsis 11 LSM proteins belong to the different subgroups that have evolved previous to eukaryotic diversification (Anantharaman et al., 2002; Veretnik et al., 2009). Searches of LSM proteins in other representative plant species revealed that all plant genomes analysed contained genes encoding LSMs related to the eight conserved proteins from animals and yeast, and many of them were present in more than one copy as a consequence of the genome duplication events that had taken place in plant lineages during their evolution (Proost et al., 2011).

Subcellular localization and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) experiments support the existence of a **nuclear LSM complex** composed by LSM2 to LSM8 proteins. First, we examined the subcellular distribution of the Arabidopsis LSM8 protein, the putative homolog of the yeast LSM8 protein that is specific of the nuclear LSM complex,

and LSM4 protein, that in yeast participates in both nuclear and cytoplasmic complexes (Beggs, 2005). The analysis was performed with transgenic Arabidopsis expressing LSM-GFP fusion proteins. The results suggest that LSM8 is specifically located in the nucleus while LSM4 simultaneously localized in the nucleus and in the cytoplasm. Next we assayed *in vivo* LSM-LSM interactions by means of BiCF in *Nicotiana benthamiana* leaves. Our results suggest that LSM8 interacts with LSM2 and LSM4, following the same pattern of interaction described for yeast and humans nuclear LSM complex. Moreover, consistent with the existence of two LSM complexes with different subcellular localization, LSM8 and LSM1 proteins did not interact with each other. Finally, the changes in the subcellular distribution of LSM4 in LSM8-deficient plants support the notion that LSM8 protein is essential for the formation of the nuclear complex in Arabidopsis.

In yeast and mammals, the nuclear LSM complex acts in pre-mRNA splicing by stabilizing the spliceosomal U6 snRNA (Beggs, 2005). The identification and molecular characterization of two loss-of-function T-DNA mutants for *LSM8* allowed us to establish similar functions for Arabidopsis LSM2-LSM8 complex. *lsm8* mutant plants were affected in the **stability of the spliceosomal U6 snRNA**, which accordingly, resulted in **pre-mRNA splicing** defects. Compared with wild-type plants (WT), at least 469 **intron retention** events in 453 genes were detected in the *lsm8-1* mutant under our experimental conditions using tiling arrays (Affymetrix Arabidopsis Tiling 1.0R). It is probable that other mRNA splicing defects could happen, but could not be detected with the tiling platform we used (Ner-Gaon y Fluhr, 2006). The potential effect of *lsm8* mutations on gene expression was determined by analysing the tiling arrays, which, in addition to allowing splicing analysis, constitute a robust platform for detection of transcriptional activity (Laubinger y col., 2008b). Compared with the WT, 250 genes were deregulated in the *lsm8-1* mutant, demonstrating that the nuclear LSM complex regulates gene expression. Gene ontology classification of mis-spliced and deregulated genes revealed that a considerable number were related to developmental processes.

It had been reported that proteins involved in pre-mRNA splicing play an essential role in the development of different organisms (Mayes y col., 1999; Liu y col., 2004), included Arabidopsis, the absence of some of them being lethal (Groß-Hardt y col., 2007; Meinke y col., 2008; Liu y col., 2009). Arabidopsis plants deficient in LSM8 also displayed **development alterations**, but they were viable. *lsm8* mutants exhibited alterations in the number of cotyledons and their leaves had shorter petioles and were smaller and flatter than in WT plants. The root length and the number of secondary roots were reduced in *lsm8* mutants compared with the WT. Regarding the reproductive phenotypes, the mutants flowered earlier than WT under short-day photoperiod and produced shorter siliques that contained fewer seeds frequently aborted. Therefore, *lsm8* mutants are affected both in vegetative and reproductive developmental traits, indicating that the LSM2-LSM8 complex is required for the normal development of Arabidopsis throughout the different phases of its life cycle.

The phenotypes observed in *lsm8* mutants and in plants deficient in other components of the spliceosome suggest a tight control of splicing during development. Embryogenesis seems to be particularly sensitive to defects in the spliceosome. An elevated number of splicing mutants are lethal (Groß-Hardt y col., 2007; Meinke y col., 2008; Liu y col., 2009) and those that are viable, like *lsm8* mutants, exhibit alterations that point to altered embryogenesis, as the supernumerary cotyledons (Petricka y col., 2008; Casson y col., 2009; Chung y col., 2009). Flowering is another trait that is affected in a great number of splicing mutants. Nevertheless, these mutants have different flowering phenotypes (Lee y col., 2006; Wang y col., 2007; Swaraz y col., 2011; Wang y col., 2012b), which suggest that each spliceosomal protein controls the splicing of specific pre-mRNAs.

The analysis of the tiling arrays unveiled that 65 out of 453 genes that showed intron retention events, and 67 out of 250 of the deregulated genes in *lsm8* mutants, were related to different developmental processes throughout the Arabidopsis life cycle. However, it is obvious that these numbers should be considerably higher taking into account that only 2-week-old plants were analyzed. We propose that the cumulative defects in gene expression are responsible for the abnormal developmental phenotypes observed in *lsm8* mutants.

The comparison of genes with intron retention between *lsm8* and other splicing mutants (*sad1*, *skip/prp45* and *rdm16/prp3*) revealed few common genes (Wang y col., 2012; Huang y col., 2013; Cui y col., 2014). This should reflect different experimental conditions, like the developmental stage of the samples, but also indicates that different proteins of the spliceosome may function on specific pre-mRNAs, as is also suggested by the different developmental phenotypes of their respective mutants (Wang y col., 2012; Huang y col., 2013; Cui y col., 2014).

Freezing tolerance assays were performed to determine the possible role of LSM8 in cold acclimation. In a first set of experiments, constitutive freezing tolerance was established for *lsm8* and WT plants. In both cases, the temperature at which half of the plants died (LT_{50}) were $-6^{\circ}C$, indicating that the LSM2-LSM8 complex is not involved in the constitutive freezing tolerance of Arabidopsis. Next, their abilities to cold acclimate was tested by placing *lsm8* and WT plants at $4^{\circ}C$ during 7 days prior to freezing. After cold acclimation, the LT_{50} of WT was $-8^{\circ}C$, while that of *lsm8* mutants was $-9^{\circ}C$, showing an increased capacity of acclimation to low temperatures. These results demonstrate that LSM2-LSM8 complex is a **negative regulator of cold acclimation** in Arabidopsis.

In order to evaluate the role of LSM2-LSM8 complex in the splicing of cold-induced genes, a tiling array was performed with RNAs of cold treated WT and *lsm8* plants. According to the results obtained the LSM2-LSM8 complex controls the splicing of 547 introns in 525 genes. As stated before, due to the lack of sensitivity of the tiling microarrays, it is very likely that the number of mis-spliced genes is higher, and that intron retention

is not the only type of splicing defect in *lsm8* mutants. A comparison with published transcriptomic data indicated that 40% of the genes with retained introns in the mutants were cold-regulated, and gene ontology analysis revealed enrichment in genes encoding nuclear and chloroplast proteins (Berardini y col., 2004; Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006 ; Matsui y col., 2008). *EMF2* and *PRR5* are genes encoding nuclear proteins that were mis-spliced in *lsm8* mutants. Both, *EMF2* and *PRR5*, had been reported to control cold-induced gene expression and to be negative regulators of cold acclimation in *Arabidopsis* (Nakamichi y col., 2009; Kim y col., 2010; Guan y col., 2013). The nuclear complex, therefore, regulates cold acclimation by ensuring the **correct splicing of cold-inducible** genes encoding transcriptional regulators and/or proteins with a direct effect in the development of this adaptive response.

The analysis of the tiling array for gene expression unveiled 220 deregulated genes in the *lsm8* mutant after cold treatment. 46% of these genes were cold-regulated according to published transcriptomic data (Lee y col., 2005; Vogel y col., 2005; Oono y col., 2006 ; Matsui y col., 2008). Gene ontology analysis of the up-regulated genes in the *lsm8* mutant revealed a significant high number of transcription factors (for example: bZIP60, WRKY25 and SZF1) that can be involved in the response to low temperature. Also, there were enrichment in genes encoding mitochondrial proteins, some of which had been reported to belong to the mitochondrial stress response (for example, AOX1A and NDB2) (Van Aken y col., 2007; Van Aken y col., 2009). The same analysis of the down-regulated genes showed an elevated number of genes encoding chloroplast and photosynthetic proteins (for example LHCB2.4 and PNSL2). Both, the mitochondria and the chloroplast are very sensitive to abiotic stress, and increments on proteins that can protect them, as is the case of the mitochondrial stress response proteins, or the reduction of the photosynthetic apparatus, can be responsible for the increased freezing tolerance of the *lsm8* mutants after cold acclimation. All these results show that the nuclear LSM complex, in response to low temperatures, regulates **gene expression at the post-transcriptional level**, controlling the accurate expression of transcription factors and proteins with a direct effect in the development of this adaptive response.

Only three other components of the spliceosome have been reported to regulate cold acclimation in *Arabidopsis*, RCF1, STA1 and BRR2B, and contrary to LSM8, all of them are positive regulators of this adaptive response (Ben Chaabane y col., 2013; Guan y col., 2013). Accordingly, the comparison of the genes controlled by these proteins at the splicing level showed a low number of coincidences, which suggests that each component of the spliceosome may control the splicing of specific pre-mRNAs during cold acclimation. When the genes whose expression is controlled by LSM8, STA1 and RCF1 were compared we observed a little increase in the coincidences suggesting that certain cold acclimation pathways are strongly regulated at the post-transcriptional level.

In brief, our results show the important role of pre-mRNA splicing for the correct cold

-regulated gene expression during cold acclimation in *Arabidopsis*. After the exposure to low temperature there is an increment of LSM2-LSM8 nuclear complexes in order to control the correct splicing of genes which in turn would ensure the accurate expression of cold-regulated genes that will lead to the increment of freezing tolerance. Future works will provide clues to understand the specificity of pre-mRNAs that are spliced by the nuclear LSM complex during cold acclimation.

CONCLUSIONS

1. *Arabidopsis thaliana* has all the LSM proteins required to form heptameric complexes like the ones that have been described in humans and yeast.
2. LSM8 is essential for the formation of the nuclear LSM complex in *Arabidopsis*.
3. The LSM2-LSM8 complex of *Arabidopsis* specifically stabilizes the U6 snRNA and has a role in pre-mRNA splicing.
4. The LSM2-LSM8 complex controls normal *Arabidopsis* development by ensuring appropriate splicing and expression of selected developmental genes.
5. The LSM2-LSM8 complex acts as a negative regulator of cold acclimation in *Arabidopsis* by controlling the splicing and/or the expression of a great number of cold-inducible genes, including many transcription factors, mitochondrial stress response genes and photosynthesis related genes.

